

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Studijní program: Doktorské studium biomedicíny

Studijní obor: Experimentální chirurgie



MUDr. David Hoskovec

**Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u karcinomů
horního GIT**

Peritoneal lavage cytology and biochemistry in cases of upper GI tumours

Disertační práce

Školitel: prof. MUDr. F. Antoš, CSc.

Praha, 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze 9. 4. 2013

MUDr. David HOSKOVEC

Podpis

Identifikační záznam:

HOSKOVEC, David. *Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u karcinomů horního GIT (Peritoneal lavage cytology and biochemistry in cases of upper GI tumours)* Praha, 2013. 87 s. Dizertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. Lékařská fakulta, 1. Chirurgická klinika 1. LF UK a VFN. Školitel: prof. MUDr. F. Antoš, CSc.

Souhrn

Úvod:

Intraperitoneální výsev nádoru je častou formou projevu jeho recidivy u pacientů po operaci pro malignitu GIT. Včasná diagnostika tohoto typu recidivy a zahájení léčby ještě v asymptomatické fázi může ovlivnit průběh nemoci i kvalitu života pacienta

Hypotéza a cíle práce

Nález volných nádorových buněk a/nebo elevace onkomarkerů v peritoneální tekutině predikuje vznik intraperitoneální recidivy nádoru. Výsledky těchto vyšetření je možné použít k indikaci HIPEC.

Cílem práce je stanovení senzitivity a specifity cytologického vyšetření a hladin onkomarkerů a určení významu těchto vyšetření pro prognózu a časnou diagnostiku recidivy. Dále bylo naším cílem potvrzení použitelnosti RT PCR pro identifikaci volných nádorových buněk.

Metodika.

Materiál jsme odebírali jednak při prvotním operačním výkonu (220 nemocných) a jednak při dispenzárních kontrolách (25 nemocných). Výpotek byl vyšetřován cytologicky a biochemicky a metodou RT PCR

Výsledky

Elevace onkomarkerů případně nález volných nádorových buněk predikuje intraperitoneální rekurenci nádoru. Prognóza těchto nemocných odpovídá stadiu IV TNM klasifikace, bez ohledu na ostatní parametry TNM. Nízká senzitivita těchto vyšetření (34 % pro cytologii, 53 % pro onkomarkery) neumožňuje jejich využití jako indikátoru HIPEC. Detekce nádorových buněk pomocí RT PCR se i přes opakované změny analytického postupu nezdařila pro vysoký stupeň degradace RNA. Časnou diagnostiku peritoneální recidivy nelze t. č. rutinně využít pro nízkou senzitivitu. Radikální operace doplněná HIPEC je zatížena vyšší morbiditou i letalitou než operační výkon bez HIPEC. Paliativní laváž dutiny břišní postižené peritoneální diseminací snižuje tvorbu maligního ascitu, bez ovlivnění doby přežití (**zlepšení kvality života bez ovlivnění survival time**)

Závěr

Tato práce potvrzuje důležitost vyšetření peritoneální tekutiny pro prognózu nemocných. Nízká senzitivita a specifita prozatím brání jejich využití jako indikátoru agresivní léčby (HIPEC)

Klíčová slova:

Karcinom žaludku, karcinom pankreatu, karcinom žlučových cest, GIST, peritoneální karcinomatóza, HIPEC, peritoneální cytologie, peritoneální biochemie, cytoreduktivní výkon

Summary

Introduction:

Intraperitoneal tumor seeding is a common form of recurrence after surgery for GI tumours. Early diagnosis and treatment may influence the course of disease.

Hypothesis and objectives of the work

The finding of free tumor cells and / or elevation of tumor markers in peritoneal fluid predicts intraperitoneal tumor recurrence. The results of these tests can be used to indicate HIPEC.

Aim of this work is to determine the sensitivity and specificity of cytology and tumor markers levels and importance of these tests for early diagnosis and prognosis of recurrence. Another objective was to confirm the applicability of RT PCR for identification of free tumor cells.

Patients and methods

. Materials are sourced both during initial surgery (220 patients) and by the dispensary controls (25 patients). The peritoneal fluid was examined cytologically and biochemically too. 50 samples was examined by RT PCR.

Results

Elevation of tumor markers or finding of free intraperitoneal tumor cells predicts recurrence. The prognosis of these patients corresponds to stage IV TNM classification, regardless of other parameters TNM. Low sensitivity of these tests (34% for cytology, 53% for tumor markers) does not allow its use as an indicator of HIPEC. Due to degradation of RNA we did not confirm the value of RT PCR. Palliative lavage of the abdominal cavity prevents the formation of malignant ascites, without affecting survival (improvement of quality of life without affecting survival time)

Conclusion

This work confirms the importance of peritoneal fluid examination for the prognosis. Due to low sensitivity and specificity we cannot recommend routine use as indicator for HIPEC.

Keywords:

Gastric cancer, pancreatic cancer, biliary tract cancer, GIST, peritoneal carcinomatosis, HIPEC, peritoneal cytology, peritoneal biochemistry, cytoreductive surgery

*Co nevyléčí léky, vyléčí železo, co nevyléčí železo, vyléčí oheň,
co nevyléčí oheň, je třeba pokládat za nevyléčitelné.*

Hippokrates

Školitel: prof. MUDr. František Antoš, CSc., emeritní přednosta Chirurgické kliniky
1. LF UK a IPVZ, Nemocnice Na Bulovce Praha

Spolupracující pracoviště a osoby:

- Ústav radiační onkologie 1. LF. UK a FNB, MUDr. Kudrmann
- Oddělení patologické anatomie FNB, MUDr. Roubková, prim. MUDr. Benková
- Oddělení klinické biochemie a imunologie FNB
- Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, Mgr. Sýkora

Obsah

SOUHRN	3
SUMMARY	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	9
1 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY.	10
1.1 Epidemiologie karcinomů žaludku, pankreatu a žlučových cest ve světě a v ČR.	11
1.1.1 Karcinom žaludku	11
1.1.2 Karcinom pankreatu	12
1.1.3 Nádory žlučového stromu	13
1.2 Klasifikace nádorů GIT s ohledem na prognózu	14
1.2.1 Karcinom žaludku	14
1.2.2 Karcinom pankreatu	16
1.2.3 Nádory žlučového stromu	17
1.2.4 Gastrointestinální stromální tumory	19
1.3 Principy nádorového metastazování	19
1.4 Peritoneální nádorový rozsev	21
1.4.1 Molekulární mechanismy peritoneální diseminace	22
1.5 Klinická důležitost mikrometastáz a jejich detekce.	24
1.5.1. Význam volných nádorových buněk v peritoneální dutině	25
1.6 Stavba a funkce peritonea	25
1.6.1 Role mezotelu v diseminaci nádorových buněk	25
1.6.2 Intraperitoneální tekutina	26
2 HYPOTÉZA A CÍLE PRÁCE	29
3 MATERIÁL A METODA	30
3.1 Technika odběru	30
3.2 Cytologické vyšetření	30
3.2.1 Klasické cytologické vyšetření	30
3.3 Vyšetření RT PCR	34
3.4 Biochemické vyšetření	36
3.5 Hodnocení soubor probandů	37
3.5.1 Charakteristika souboru	37
3.5.2 Karcinom žaludku	37
3.5.3 Karcinom pankreatu	41
3.5.4 Nádory žlučového stromu	42
3.5.5 Gastrointestinální stromální nádory	43

3.6 Hypertermická cytostatická laváž	44
3.7 Statistické zpracování	50
4 VÝSLEDKY	51
4.1 Karcinom žaludku	52
4.1.1 Závislost prognózy na cytologickém a biochemickém vyšetření	54
4.1.2 Výsledky pooperačních odběrů	55
4.2 Použití HIPEC v léčbě diseminovaného karcinomu žaludku	56
4.2.1 Kasuistika – potenciál HIPEC v léčbě pokročilého karcinomu žaludku	58
4.3 Karcinom pankreatu	61
4.3.1 Vliv cytologického a biochemického vyšetření na prognózu	64
4.3.2 Výsledky pooperačních odběrů	65
4.4 Nádory žlučového stromu	65
4.4.1 Vliv cytologického a biochemického vyšetření na prognózu	67
4.5 Gastrointestinální stromální nádory	67
4.6 Vyšetření RT – PCR	67
5 VÝSLEDKY – SOUHRN	69
6 DISKUSE	70
6.1 Žaludek	70
6.2 Pankreas	72
6.3 HIPEC	72
7 SPLNĚNÍ CÍLŮ PRÁCE.	75
8 ZÁVĚR	77
9 LITERATURA	78
10 PŘEHLED PUBLIKACÍ SOUVISEJÍCÍCH S VÝZKUMEM	82

Seznam použitých zkratek

- AJCC - The American Joint Committee on Cancer – organizace, která se zabývá systematickou klasifikací nádorů.
- AUA 1 – povrchový glykoproteinový antigen na epitelálních buňkách
- B 72 – typ monoklonální protilátky
- B72,3 – typ monoklonální protilátky
- Ca 125 - cancer antigen 125, proteinový charakter
- Ca 15-3 - Carcinoma Antigen 15-3
- Ca 19-9 - carbohydrate antigen 19-9
- Ca 72-4 - Tumor-associated glycoprotein 72
- CD44 – povrchový glykoproteinový antigen
- cDNA – komplementární deoxy ribonukleová kyselina
- CEA – Carcinoembryonic antigen, glykoproteinový charakter
- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay
- EPIC - early postoperative intraperitoneal chemotherapy
- GE - gastroesofageální
- GIST – gastrointestinální stromální tumor
- GIT – gastrointestinální trakt
- HIPEC - hyperthermic intraperitoneal chemotherapy
- IFN - interferon
- IL – interleukin (různé typy se označují čísly)
- JRSGC - Japanese Research Society for Gastric Cancer
- MGG - May-Grünwald barvení
- MMP – matrixmetaloproteáza
- NK – natural killer
- P53 – tumor protein P53
- PAS - Periodic acid-Schiff – druh barvení
- PCR – polynuclease chain reaction
- RNA – ribonucleotic acid
- RT PCR – Revers transcription PCR
- TNF α – tumor necrosis factor alfa

1 Současný stav problematiky.

Posuzování prognózy a vývoje onkologického onemocnění není lehkým úkolem v základním výzkumu ani v klinické praxi. Hlavním předpokladem pro úspěšný výzkum je vycházet ze současného stavu problematiky ve světě. Abychom mohli výsledky našeho sledování validně porovnat s podobnými studiemi, musíme nejprve pevně stanovit kritéria a klasifikace. Jedná se o problematiku nádorovou, která vykazuje překotný vývoj jak ve způsobech diagnostiky, tak i klasifikace a léčby. Mimo jiné je klasickým představitelem současného trendu multioborové spolupráce.

Literární zkušenosti ukazují, že zařazení cytologického vyšetření do diagnostického algoritmu u nemocných s malignitou horní části trávicího ústrojí může přinést profit těmto pacientům. Ať již v aplikaci agresivnějších adjuvantních protokolů v případě pozitivity cytologie, nebo v rozvaze o využití kombinovaných onkochirurgických postupů (hypertermická intraoperační cytostatická laváž nebo peroperační radioterapie). Přesné postavení výsledku cytologického vyšetření v těchto indikacích ukáží až budoucí studie.

Je však potřeba zpřesnit průkaz volných nádorových buněk v peritoneální dutině. Naše zkušenosti ukazují, že především senzitivita, ale i specifická klasického cytologického vyšetření je nedostatečná. Použití onkomarkerů, především v kombinaci CEA a Ca 19-9, senzitivitu zvyšuje. K dalšímu zpřesnění by mohlo pomoci využití dalších onkomarkerů (Ca 15 - 3, Ca 72 - 4, Ca 125).

Detekci volných nádorových buněk technikou vysoce specifické Revers transskripcí – polymerase chain reaction (RT PCR) v naší studii bránil vysoký stupeň degradace nádorové RNA ve vzorcích a zároveň kontaminace vzorků dalšími buňkami – krevními, peritoneálními apod.

V souvislosti s novou verzí klasifikace AJCC (American Joint Committee on Cancer), která provedla změny především v stagingu karcinomu žaludku, by bylo vhodné a správné zavést cytologické vyšetření do rutinní praxe. Oprávněnost tohoto přístupu, i v našich podmínkách, je podpořena výsledky naší studie. Zaznamenali jsme výrazně horší prognózu pacientů s pozitivním cytologickým vyšetřením z laváže dutiny břišní.

V roce 1988 P. H. Sugarbaker (54) s kolektivem vytvořil novou koncepci léčby peritoneálních metastáz. Principem metody je chirurgická cytoredukce nádoru, následovaná peroperační intraperitoneální hypertermickou chemoterapií (HIPEC), v některých případech umocněnou ještě pooperační intraperitoneální normotermickou chemoterapií v délce 5 dnů.

Metoda vychází z předpokladu, že peritoneální metastázování má stejnou patofyziologii jako hematogenní a lymfogení rozsev (54). V současné době je všeobecně v onkochirurgii uznáván princip cytoredukce, odstranění spádových lymfatických uzlin, stejně jako je akceptována resekce jaterních a plicních metastáz (případně i jiných orgánových metastáz) gastrointestinálních tumorů.

V posledních letech byly publikovány studie, které sledují efekt chirurgického výkonu ve spojení s HIPEC (5, 9, 12, 16, 18, 23, 50, 54, 70, 74) v léčbě pokročilého karcinomu žaludku. V těchto studiích se ukazuje potenciál této kombinované terapie. Některé studie (16, 49, 69, 70, 71, 72) ukazují lepší přežívání pacientů, kteří podstoupili výkon doplněný o HIPEC a tyto rozdíly jsou statisticky významné.

Vždy je zdůrazněna nutnost pokud možno kompletní cytoredukce. Výsledky významně ovlivňuje rozsah postižení peritonea (pouze T3 a T4 vs. Gilly 1 - 2 vs. Gilly 3 - 4). Naproti tomu Hall neprokázal statisticky signifikantní zlepšení přežívání u souboru s a bez použití HIPEC (19). Metaanalýza z roku 2004 pouze konstatuje, že HIPEC může přinést zlepšení výsledků léčby u pacientů s pokročilým karcinomem žaludku. Do metaanalýzy bylo

zahrnuto 11 studií s celkovým počtem 1161 pacientů (69). Autoři ale uvádějí, že pouze 3 studie měly vyšší kvalitu podle Oxfordského skórovacího systému. Novější metaanalýza z roku 2007, která zahrnuje 13 studií s celkem 1648 pacienty, ukazuje statisticky signifikantní prodloužení přežití při kombinaci chirurgického výkonu, doplněného intraoperační hypertermickou chemoterapií, případně ještě potencionovanou časnou pooperační intraperitoneální chemoterapií (EPIC)(73).

V roce 2009 byly publikovány výsledky Yanga (71), který porovnával skupinu nemocných s peritoneálním rozsevem u karcinomu žaludku, který byl léčen pouhou cytoredukcí, nebo cytoredukcí doplněnou HIPEC. Ve skupině s HIPEC bylo přežití lepší, ale bez statistické významnosti.

Proto jsme se rozhodli navázat na tyto studie. Zavést na vlastním pracovišti vyšetření peritoneální laváže a zohlednit jeho výsledky pro diagnostické a léčebné procedury. Dále zhodnotit, jak se námi zpřesněné postupy odrazí na délce přežití nemocných.

1.1 Epidemiologie karcinomů žaludku, pankreatu a žlučových cest ve světě a v ČR.

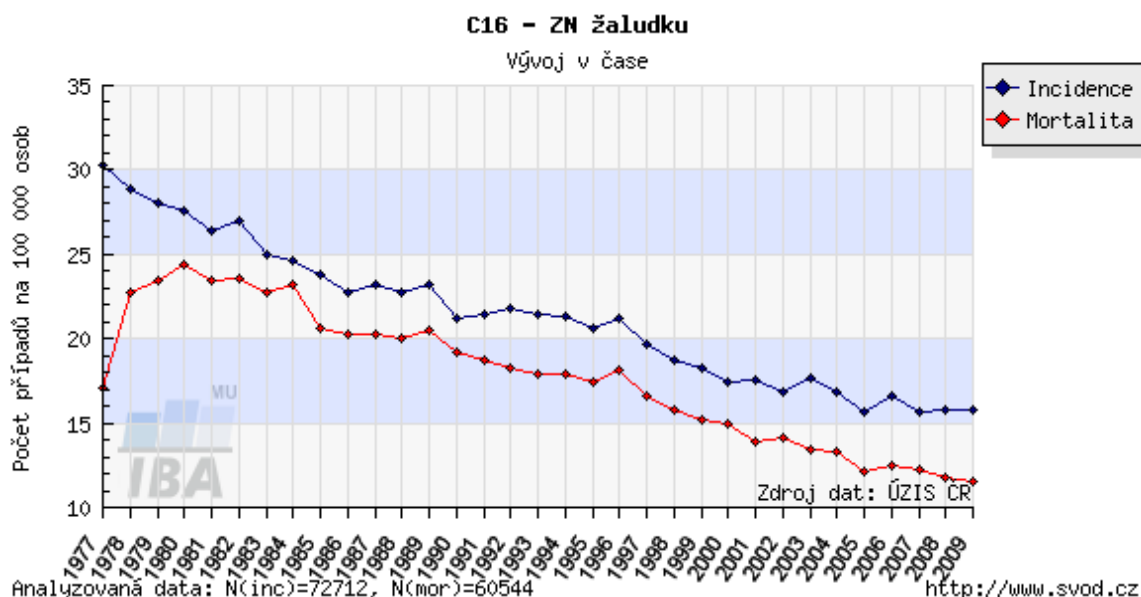
Jde o skupinu tří maligních nádorů, kterým je společná pozdní diagnostika, výrazná agresivita a relativní rezistence vůči onkologické léčbě. Do sledované skupiny jsme přidali GIST (gastrointestinální stromální nádor), který je sice nádorem mesenchymálním, ale má stejnou tendenci k lokoregionálním recidivám a k intraperitoneálnímu metastázování.

Jedinou nadějí na vyléčení tohoto onemocnění představuje adekvátní chirurgický výkon. Vzhledem k absenci klinických známek v časně fázi nemoci, je u většiny pacientů diagnostikována nemoc až v pokročilém stadiu, kdy již radikální terapie většinou není možná. V ČR je cca pouze u maximálně 20 % nemocných potvrzena diagnóza ve fázi, kdy je šance na radikální léčbu. Incidenční studie ukazují u všech tří typů karcinomů výrazné geografické rozdíly ve výskytu.

1.1.1 Karcinom žaludku

Karcinom žaludku představuje celosvětově čtvrtou nejčastější malignitu. Každoročně je diagnostikováno kolem 600.000 nových případů. Jeho incidence je výrazně geograficky vázána. Nejvyšší výskyt je v dálnovýchodních zemích, kde je zachyceno více než 70 % všech diagnostikovaných tumorů (2, 10, 27, 28 48, 52, 67). V ČR má incidence karcinomu žaludku klesající tendenci, jak ukazuje následující graf (68). (Graf 1)

Graf 1:
Incidence a mortalita karcinomu žaludku v ČR



Z grafu je patrné, že mortalita klesá symetricky s incidencí. Prognóza nemocných s touto diagnózou se však nemění.

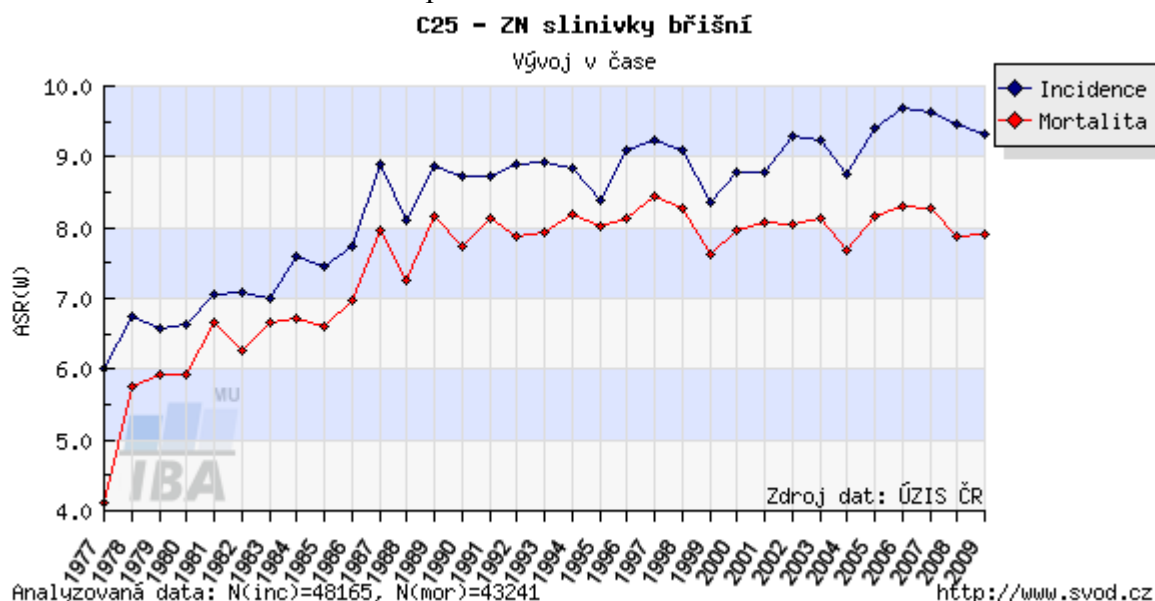
1.1.2 Karcinom pankreatu

Výskyt karcinomu pankreatu stoupá, především v západních zemích. Jedná se o jeden z nejagresivnějších nádorů, u kterého se prakticky incidence rovná mortalitě a 5 leté přežití se blíží 0 %. V USA se udává incidence 11 – 12 onemocnění/100.000 obyvatel na rok, s poměrně velkými etnickými diferencemi (24, 36, 53, 60, 61, 62).

Také v ČR má výskyt karcinomu pankreatu vzestupnou tendenci (graf 2). V současné době již počty nově diagnostikovaných nemocných jsou vyšší než u nádorů žaludku. Současně dle posledních dostupných dat ÚZIS je incidence tohoto nádoru v ČR druhá nejvyšší na světě (68).

Graf 2:

Incidence a mortalita karcinomu pankreatu v ČR



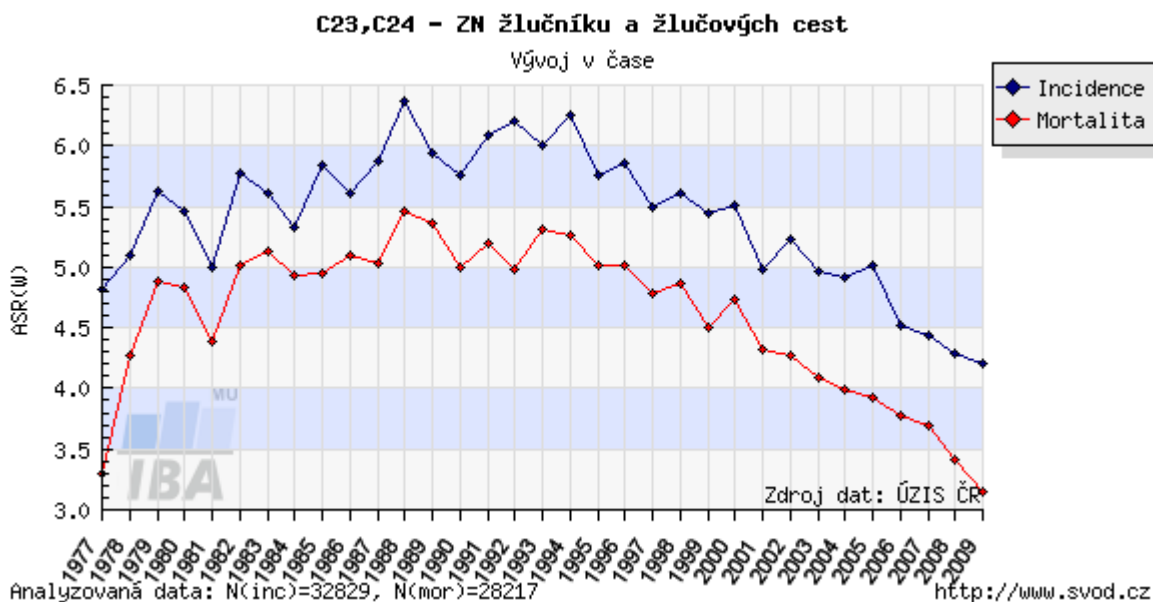
1.1.3 Nádory žlučového stromu

Nejčastějším nádorem extrahepatických žlučových cest je karcinom žlučníku. Incidence v USA je asi 2,5 onemocnění/100.000 obyvatel/rok. Celosvětově je nejvyšší výskyt ve státě Izrael (7,5 onemocnění/100.000 obyvatel/rok u mužů a 13,8 onemocnění/100.000 obyvatel/rok u žen) a ve státech Jižní Ameriky (Chile, Peru). Naopak vzácný je v Indii, Singapuru a Nigerii (59, 60).

Incidence nádorů žlučového stromu *bez karcinomu žlučníku* je v USA asi 1 onemocnění/100.000 obyvatel/rok, nejvyšší počty opět mají jihoamerické země, Izrael a Japonsko.(26, 64)

V ČR je frekvence zachytu onemocnění stacionární (graf 3). Pohybuje se mezi 4 – 6 pacienty na 100.000 za rok (68).

Graf 3:
Incidence a mortalita nádorů žlučového stromu v ČR



1.2 Klasifikace nádorů GIT s ohledem na prognózu

Základním klasifikačním systémem v onkologii je TNM klasifikace. V práci je použita 6. verze klasifikace, která byla platná v době, kdy probíhala experimentální část práce. Bohužel pro naše účely není tato klasifikace dostatečně podrobná, protože nedokáže odlišit peritoneální rozsev od jiných forem generalizace. Rovněž nepracuje s výsledky cytologického vyšetření. V Japonsku a dalších asijských zemích jsou používány klasifikace pracovních skupin pro jednotlivé diagnózy, které jsou obvykle mnohem komplexnější. Obě používané klasifikace (TNM i japonské) mají dobrou prediktivní hodnotu pro přežití. Vzhledem k tomu, že u nás je používána TNM klasifikace všeobecně známá, uvádíme pouze stručný přehled této klasifikace u sledovaných diagnóz a vliv stadia nemoci na přežití.

1.2.1 Karcinom žaludku

V současné době je platnou klasifikací verze 7. V práci použita verze 6, která byla platná v době, kdy se práce vytvářela (Tab. 1, Graf 4)

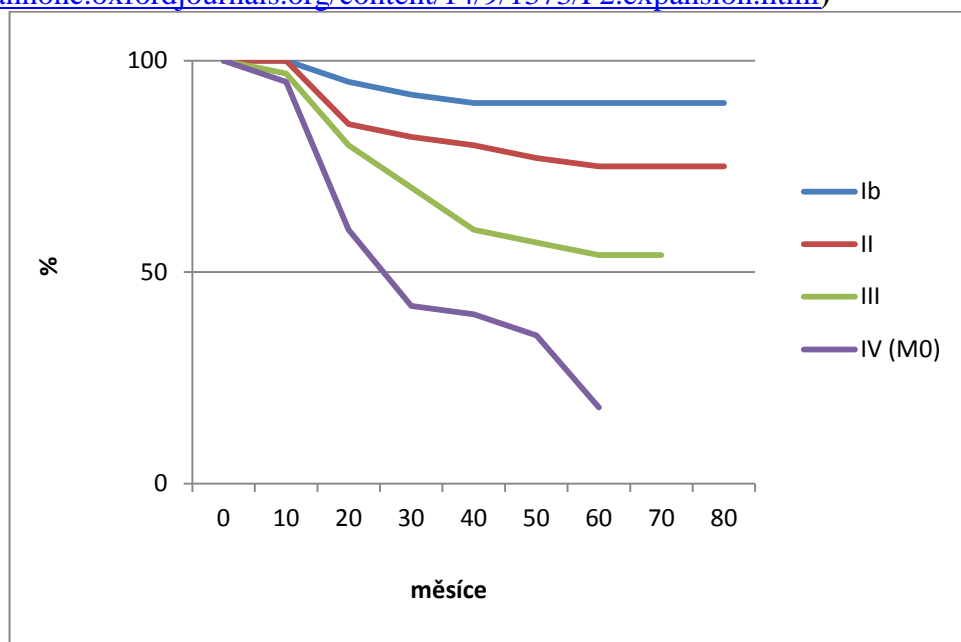
Rozdělení do stadií (3, 4, 13, 14)

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
III	T3	N2	M0
IV	T1, T2, T3	N3	M0
	T4	N1, N2, N3	M0
	Každé T	Každé N	M1

Graf 4

Prognóza karcinomu žaludku v závislosti na stadiu (upraveno podle

<http://annonc.oxfordjournals.org/content/14/9/1373/F2.expansion.html>)



Hlavní rozdíly mezi V6 a V7

Tumory infiltrující gastroesofageální (GE) junkci a zasahující do 5 cm od této junkce distálně jsou klasifikovány jako tumory jícnu

- Změna T, N i M hodnocení
- Přepřacování stadií

1.2.2 Karcinom pankreatu

V případě karcinomu pankreatu se verze 6 TNM klasifikace neliší od verze 7. TNM klasifikace rozlišuje karcinom pankreatu a periampulární karcinom, který má lepší prognózu (pravděpodobně proto, že je díky rychlému nástupu ikteru diagnostikován dříve). (Tab. 2, 3, Graf 5, 6)

Karcinom pankreatu

Tab. 2

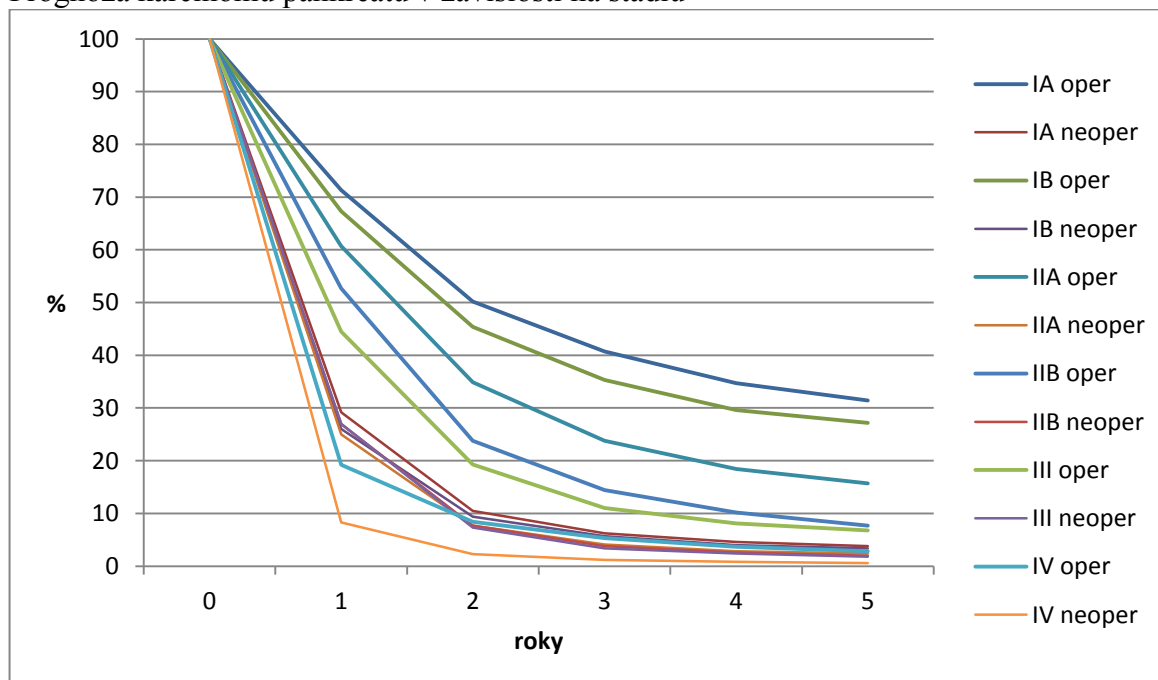
Rozdělení do stadií (3, 4)

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Každé N	M0
IV	Každé T	Každé N	M1

Stadia jsou rozdělena tak, že stadium III je lokalizovaný neresekabilní tumor a pro stadium IV jsou typické vzdálené metastázy.

Graf 5

Prognóza karcinomu pankreatu v závislosti na stadiu



Periampulární karcinom

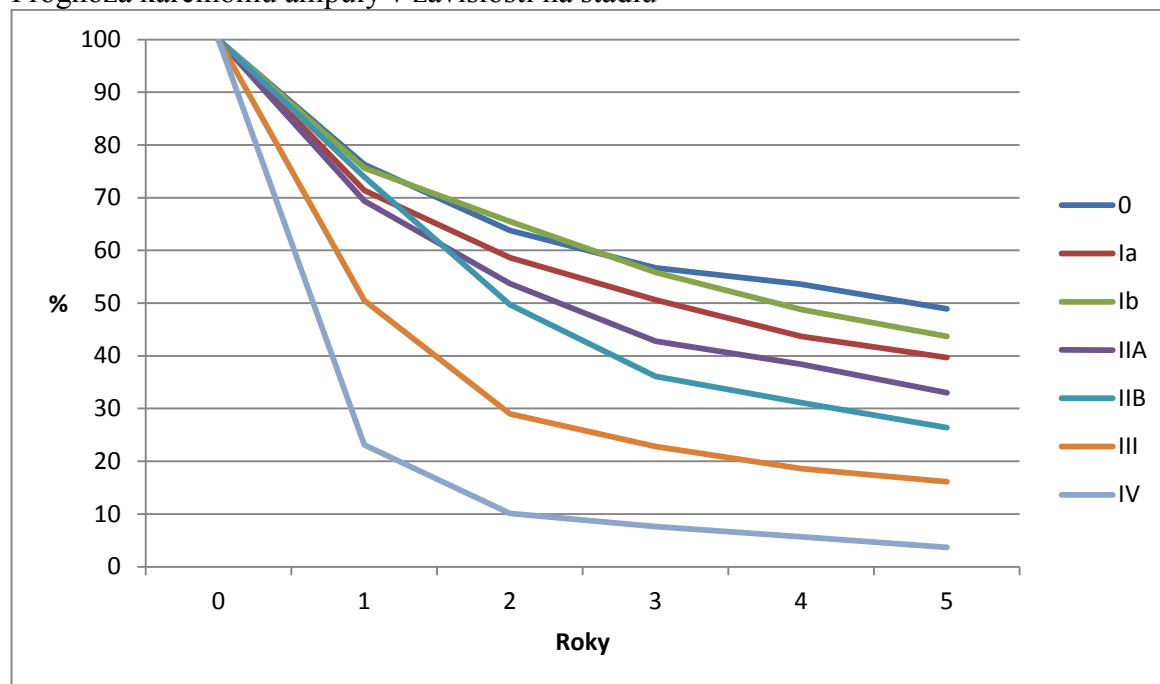
Tab. 3

Rozdělení do stadií

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Každé N	M0
IV	Každé T	Každé N	M1

Graf 6

Prognóza karcinomu ampuly v závislosti na stadiu



1.2.3 Nádory žlučového stromu

6 a 7 verze klasifikace TNM se liší rozdělením klasifikace extrahepatických žlučových cest na perihilární oblast a distální žlučovod. Hranicí je konfluens dd. hepatici a junkce d. cystikus a d. hepaticus communis. Jinak jsou stadia u karcinomu žlučníku i žlučovodu v obou verzích hodnocena stejně. (Tab. 4, 5, Graf 7)

Žlučník

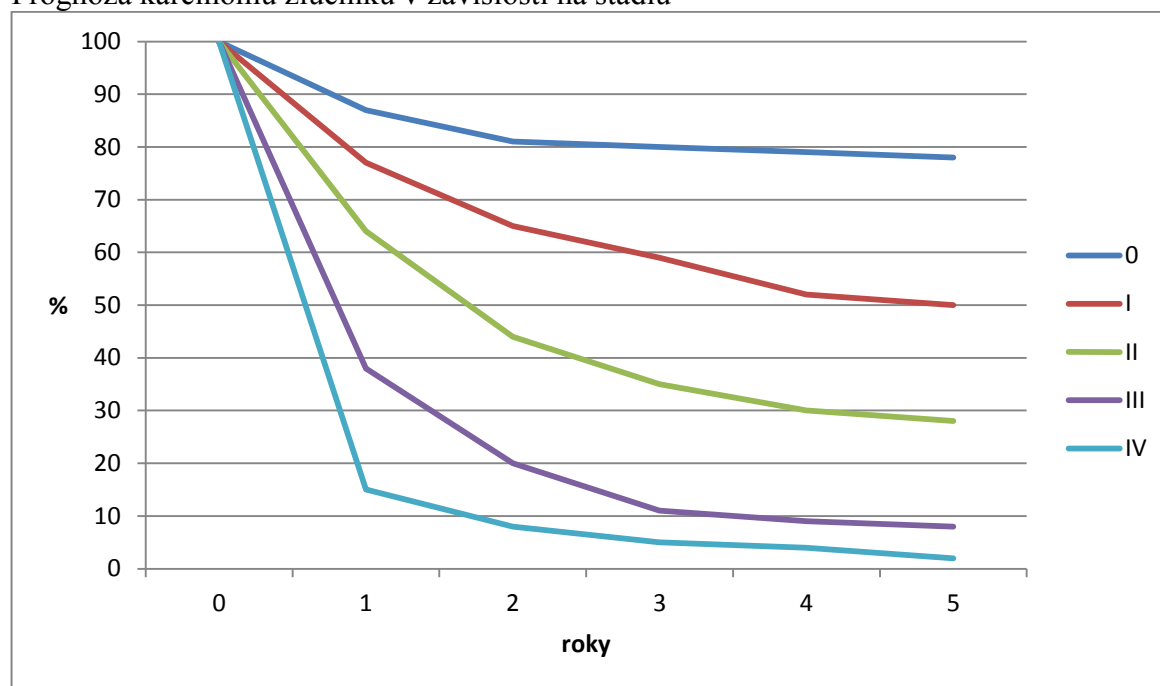
Tab. 4

Rozdělení do stádií

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Každé N	M0
IV	Každé T	Každé N	M1

Graf 7

Prognóza karcinomu žlučníku v závislosti na stadiu



Karcinom extrahepatických žlučových cest

Tab. 5

Rozdělení do stádií

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
Ia	T1	N0	M0
Ib	T2	N0	M0
IIa	T3	N0	M0
IIb	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
III	T4	Každé N	M0
IV	Každé T	Každé N	M1

1.2.4 Gastrointestinální stromální tumory

Reprezentují pouze 1 % všech nádorů zažívacího traktu. Jsou nejčastějším mezenchymálním nádorem GIT. Jejich incidence se odhaduje na 1,5/100 000 obyvatel za rok.

V TNM klasifikaci verze 6 nebyly klasifikovány, ve verzi 7 již ano. V naší práci jsme použili 2 starší klasifikace – Aminovu a Fletcherovu. Podrobnosti klasifikací jsou uvedeny dále.

Tento typ tumoru byl zařazen do studie pro své biologické chování s velkou tendencí k vytváření peritoneálních a lokoregionálních metastáz.

1.3 Principy nádorového metastazování

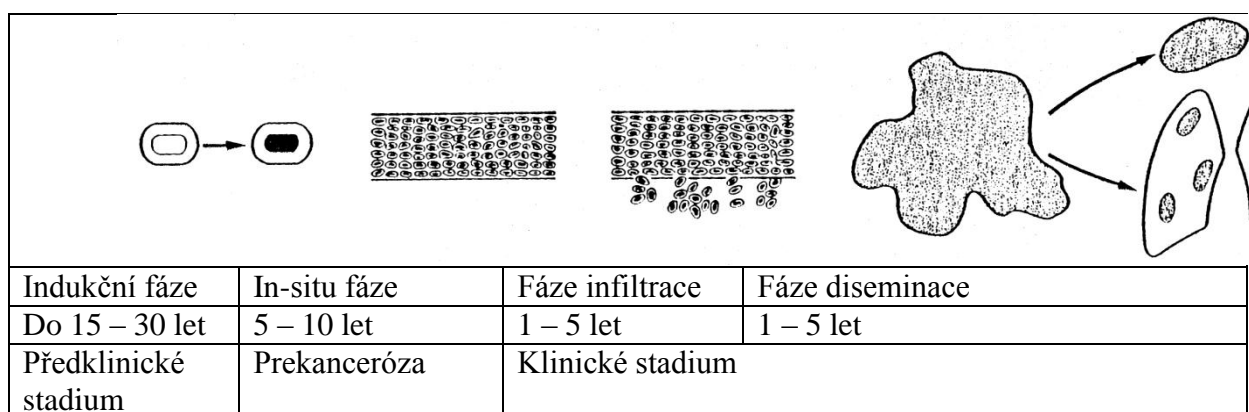
Hlavním tématem práce je posuzování charakteru výskytu recidiv nádorů podle cytologických a biochemických ukazatelů, proto uvádím stručně současný názor na způsob nádorového rozsevu.

Metastazování tumoru je složitý vícestupňový proces, který vede k diseminaci buněk z původně lokalizovaného procesu po organismu a vzniku vzdálených metastáz. (Obr 1) Generalizace nádoru je zodpovědná za cca 90 % úmrtí onkologických nemocných (14, 24). V průběhu metastazování dochází k složitým interakcím mezi nádorovými buňkami, extracelulární matrix a cílovou tkání.

Je experimentálně ověřeno, že pouze 1 buňka z populace 10^6 buněk primárního nádoru má metastatický potenciál (15, 24).

Obr. 1

Čtyřfázový koncept maligního onemocnění (Upraveno podle Gall F. P., Hermanek P., Tonak J.: Chirurgische Onkologie, Springer Verlag 1986 ISBN 3-540-13202-3)



Proces metastazování se skládá z několika kroků (14, 24, 59) (obr. 2, 3):

1/ Uvolnění buněk z buněčných adhesí. Dochází ke ztrátě buněčné interakce. Zvláštní význam má v této fázi epiteliální E-kadherin, který zprostředkovává buněčnou adhesi.

2/ Invaze nádorových buněk do submukózy a cév. Invazi umožňuje aktivace proteolytických enzymů, jako jsou matriční metalo-proteinové enzymy (MMP). Tyto proteázy mohou být produkovány nádorovou buňkou i okolním stromatem.

3/ Extravazace nádorových buněk do dutin, lymfatických a krevních cév. Nádorové buňky jsou schopny indukovat aktivitu trombocytů a tím způsobovat vznik mikrotrombů. Specifické adhesivní molekuly (např. selektin) umožňují nádorové buňce se vázat na endotel,

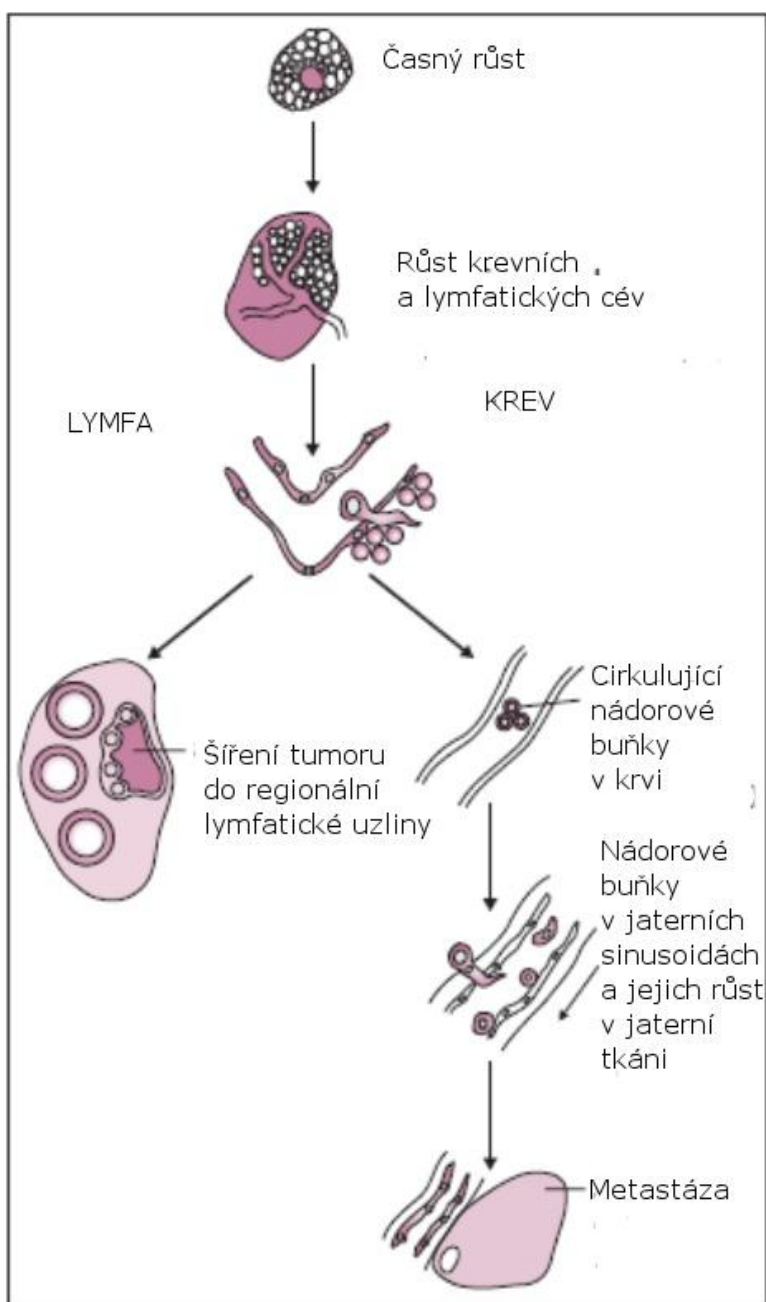
který reaguje s nádorovou buňkou, která působí na basální membránu, rozpouští ji a poté proniká do cílové tkáně.

Po úspěšném proniknutí za cévní stěnu se často subendoteliálně objevují malé kolonie tumorózních buněk – mikrometastázy.

4/ Angiogeneze. Za příznivých podmínek produkují nádorové buňky, ale i okolní stroma, růstové faktory, které ve svém důsledku vedou k novotvorbě cév a vzniku makrometastáz. Nádory do velikosti 1 – 2 mm³ mohou být vyživovány difúzí, u větších je k výživě potřeba novotvořených cév. Pokud nejsou vytvořeny podmínky k růstu metastázy, mohou buňky zůstat viabilní a po čase mohou být (i po letech) výchozím zdrojem makrometastáz. Tyto kolonie se označují jako spící metastázy (tumor dormancy).

Obr. 2

Tkáňová invaze a vznik metastáz

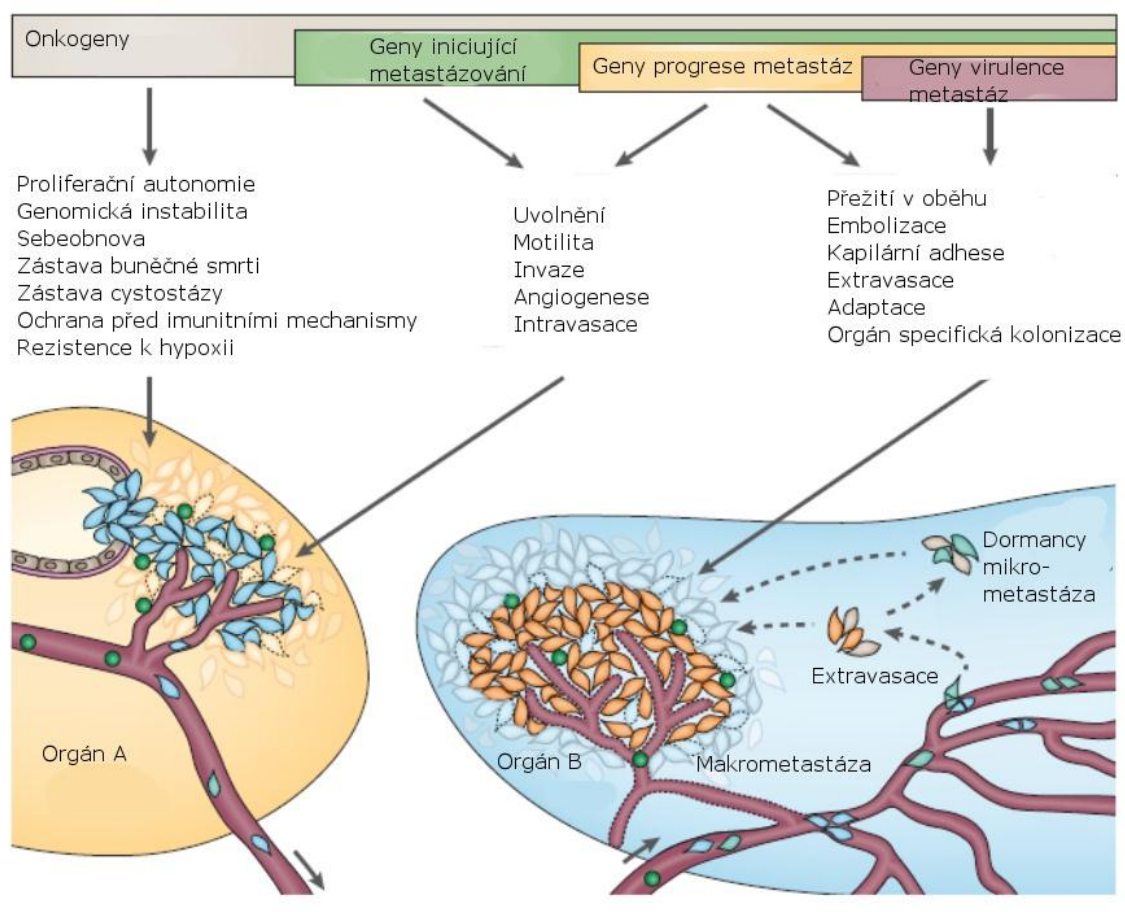


Metastazování není náhodný proces. Je známo, že různé nádory preferenčně metastazují do různých míst. Existují 3 hypotézy, vysvětlující tento jev (14, 24).

- *growth factor teorie* – nádorové buňky pronikají do různých tkání se stejnou frekvencí, ale replikují se pouze tam, kde nacházejí pro růst příznivé podmínky
- *adhesní teorie* – endoteliální buňky v různých orgánech produkují různé typy adhesních molekul a tím umožňují adhezi pouze některých nádorových buněk
- *chemokinová teorie* – buňky cílového orgánu produkují chemokiny, které pronikají do oběhu a působí na nádor, tak že produkuje buňky se specifickým receptorem reagujícím na chemokiny.

Obr. 3

Regulace metastatického procesu (podle Nguyen D. X, Massagué J.: Genetic determinant of cancer metastasis, Nature reviews, Vol 8, 2007 341 – 352)



1.4 Peritoneální nádorový rozsev

Peritoneální rozsev nádorů GIT je považován za pokročilé (metastazující) onemocnění (stadium IV) s extrémně nepříznivou prognózou a očekávanou dobou přežití pouze několik měsíců. Standardními onkologickými metodami (radioterapie a chemoterapie) je tento proces prakticky neovlivnitelný. P. H. Sugarbaker s kolektivem vytvořil novou koncepci léčby peritoneálních metastáz. Principem metody je chirurgická cytoredukce následovaná peroperační intraperitoneální hypertermickou chemoterapií (HIPEC) v některých případech

následovanou ještě pooperační intraperitoneální normotermickou chemoterapií v délce 5 dnů (54). Vychází z předpokladu, že peritoneální metastazování má stejnou patofyziologii jako hematogenní a lymfogení metastázování (12, 54).

Kombinace chirurgického a onkologického přístupu v léčbě peritoneálních metastáz je nezbytná, protože v případě peritonektomie nelze dosáhnout R0 resekce. V dutině břišní vždy zůstávají viabilní nádorové buňky, které jsou základem rekurence onemocnění. Tyto buňky jsou obtížně zasažitelné pooperační i. v. chemoterapií, protože se „skryjí“ v avaskulárních intraperitoneálních adhesích. Navíc zde působí plasma – peritoneální bariéra, která brání průniku cytostatik ze systémového řečiště do peritoneální dutiny (12, 17, 18).

Implantační metastázy – vznikají třemi cestami (38, 39)

- intrakavitální metastázy – při průniku nádorových buněk přes serózu vznikají pleurální a peritoneální metastázy
- intraluminální metastázy – dochází k šíření nádoru v lumen dutého orgánu
- iatrogenní implantační metastázy – dochází k implantaci nádorových buněk během operace při manipulaci s nádorem, event. otevřením cév (především lymfatických) s nádorovými buňkami

1.4.1 Molekulární mechanismy peritoneální diseminace (Obr 4)

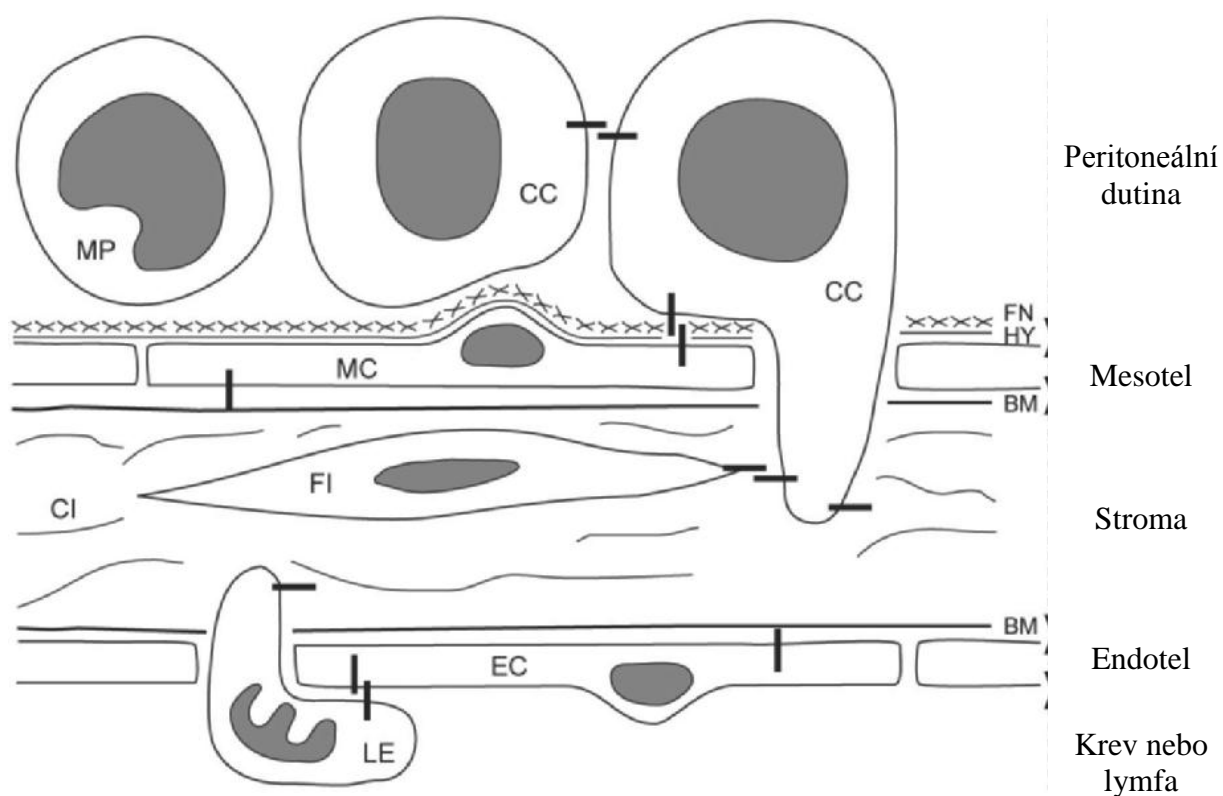
Stejně jako u ostatních typů metastázování je peritoneální diseminace nádoru vícekový proces. (Obr 4, 5) Prvním krokem je uvolnění volných nádorových buněk z primárního tumoru. Klíčovou molekulou ovlivňující tento krok je E cadherin. Další je navázání nádorových buněk na peritoneum. K tomu může dojít buď trans-mesoteliálně, nebo trans-lymfaticky (59, 60, 69). (Obr 5)

Při trans-mesoteliální cestě dochází k přímému navázání nádorových buněk na mesoteliální buňky peritonea. To je ovlivněno CD44. Over-exprese CD44 nádorovou buňkou predikuje intraperitoneální metastázování. Většina těchto nádorových buněk zahyne v důsledku existence bariéry mezi krví a peritoneem. Část buněk ale pronikne do submesoteliálního prostoru a posléze pronikají bariérou mezi krví a peritoneem. Tyto 2 kroky ovlivňují TNF α a IL-8, MMP7 (69).

Trans-lymfatickou cestou nádorové buňky pronikají do peritoneální dutiny přes subperitoneální lymfatické siny a lymfatická stomata. Tato stomata jsou především ve velkém omentu, epiploických apendixech, bránici, v oblasti lig. falciforme, Douglasově prostoru a mesenteriu tenkého střeva.

Obr. 4

Mikroekosystém peritoneálních metastáz (podle Lee HS et al. ITCs and micrometastases in gastric cancer, World J Gastroenterol October 14, 2005 Volume 11 Number 38)



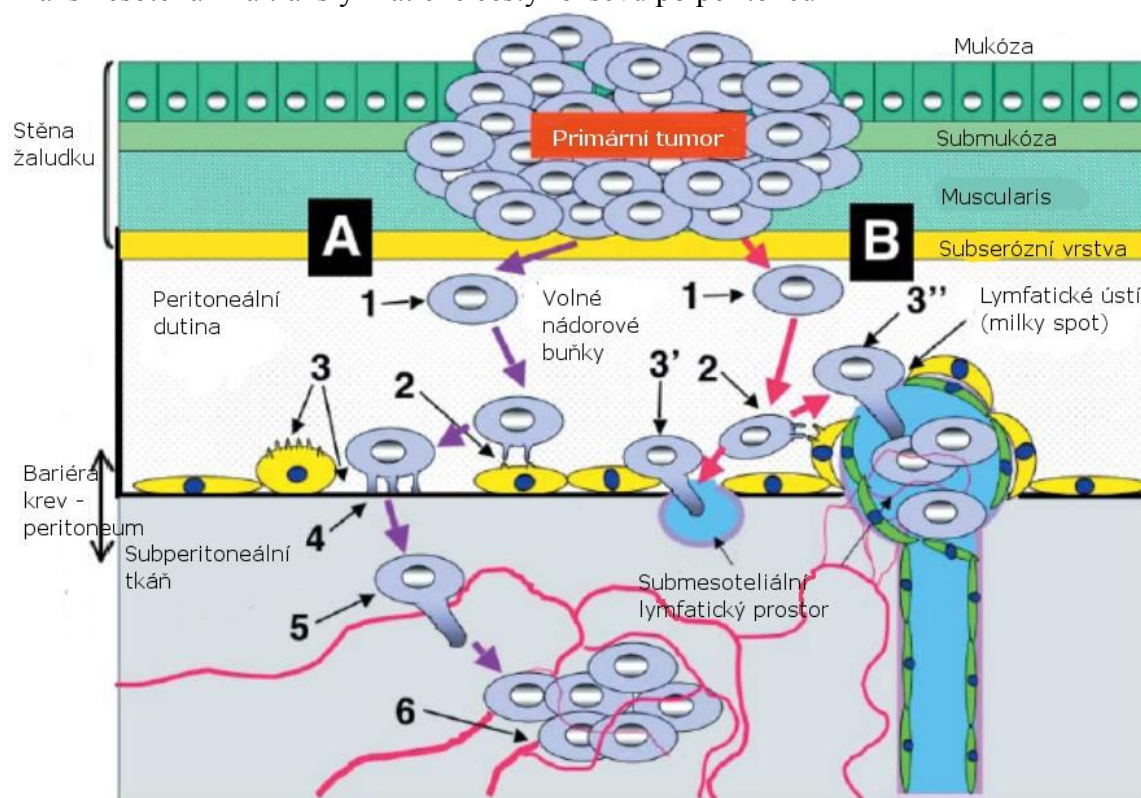
CC nádorové buňky
CI kolagen typu 1
LE leukocyty
HY hyaluronát

BM basální membrána
FI fibroblasty
MP mikrofágy
FN fibrin
FI fibroblasty

LE leukocyty
EC endoteliální buňky
MC mesoteliální buňky
BM basální membrána
EC endoteliální buňky

Obr. 5

Transmesoteliální a translymfatické cesty rozsevu po peritoneu



A transmesoteliální rozsev

- 1 – uvolnění nádorových buněk od serózy
- 2 – adheze k mesoteliálním buňkám
- 3 – kontrakce mesoteliálních buněk a basální membrány
- 4 – adheze k submesoteliální basální membráně
- 5 – invaze do submesoteliální tkáně
- 6 – vaskulární neogeneze, lymfangiogeneze a lymfatická dilatace

B Translymfatický rozsev

- 1 – uvolnění nádorových buněk od serózy
- 2 – adheze k mesoteliálním buňkám
- 3' – průnik do lymfatických orificií
- 3'' – invaze přes lymfatická stomata

1.5 Klinická důležitost mikrometastáz a jejich detekce.

Před vznikem makro-metastázy, detekovatelné standardními diagnostickými postupy, se v organismu nachází volné nádorové buňky a shluky nádorových buněk, které by při jejich včasné detekci mohly změnit TNM stadium nádoru a tím i léčebný postup. Buňky jsou obvykle ve fázi G0 buněčného cyklu, kdy jsou odolné vůči chemoterapii. Konvenční histopatologické vyšetření má méně než 1 % pravděpodobnost identifikovat malá metastatická ložiska 3 buněk v uzlinách (v průměru). Při použití imuno-histochemických metod dochází k 5 – 20 % posunu stadia N0 na N1. Při použití monoklonálních protilátek je 95 % pravděpodobnost záchytu nádorové buňky mezi 2×10^6 buněk. Ještě vyšší procento záchytu nádorových buněk lze dosáhnout pomocí molekulárních metod (PCR).

Prognostický význam mikrometastáz v uzlinách na průběh onemocnění je prokázán řadou studií (21, 38, 39, 45, 69, 73).

1.5.1. Význam volných nádorových buněk v peritoneální dutině

Maligní transformace buněk vede k změnám exprese povrchových adhesivních molekul a poté k uvolnění buněk do peritoneální dutiny (37). Předpokládá se, že přítomnost volných nádorových buněk v peritoneální dutině předchází vzniku peritoneální karcinomatózy. Četnost nálezů těchto buněk koreluje s T stadiem nádoru. Nádorové buňky se mohou uvolňovat do peritoneální dutiny poté, co nádor proroste přes serózní vrstvu. Ale i časnější stadia nádorů, kde ještě nedošlo k infiltraci peritonea, mohou uvolňovat nádorové buňky do peritonea (38). Za faktory, které zvyšují výskyt volných nádorových buněk, jsou považovány vaskulární invaze a lymfatické metastázy (56).

Pozitivní cytologie je jak u žaludečních tak u pankreatických karcinomů nejdůležitějším faktorem peritoneální rekurence, u nádorů pankreatu predikuje zvlášť agresivní onemocnění (51).

Tab. 6

Volné nádorové buňky vs. mikro-metastázy

	Volné nádorové buňky	Mikro-metastáza
Velikost	Volné buňky, nebo malé shluky (clustery)	$\leq 0,2$ cm v největším průměru
Kontakt s krevními a lymfatickými cévami	Ne	Ano
Extravaskulární stromální reakce	Ne	Obvykle ano
Extravaskulární proliferace	Ne	Ano

1.6 Stavba a funkce peritonea

Peritoneum je tvořeno vrstvou mesoteliálních buněk. Mesoteliální buňky jsou obvykle ploché, mohou být ale i kuboidní (např. v parenchymových orgánech a tzv. „milky spots“ omenta). Pod vrstvou mesoteliálních buněk je basální membrána a stroma obsahující krevní a lymfatické cévy, mikrořágy, lymfocyty a buňky podobné fibroblastům. Funkčně tvoří mesotelová vrstva semipermeabilní membránu. Ta není homogenní, jsou v ní vytvořena „stomata“ o průměru 3 – 12 μm , která jsou mezi dvěma a více buňkami. (1) Tato představují přímý vstup do submesoteliálního lymfatického systému a umožňují rychlé vstřebání tekutin, bakterií a buněk z peritoneální dutiny. Stomata se predilekčně nacházejí v místech, kde jsou kuboidní mesotelie (5, 9). Peritoneum plní více funkcí ochrannou, imunitní (schopnost reagovat zánětlivou reakcí), regenerační a fibrin regulační (5).

1.6.1 Role mezotelu v diseminaci nádorových buněk

Proces diseminace nádorových buněk po peritoneu se skládá ze 4 kroků (5, 9)

- uvolnění nádorových buněk z primárního nádoru
- navázání těchto buněk na vzdálené peritoneum
- invaze do subperitoneálního prostoru
- proliferace a novotvorba cév

V peritoneální dutině jsou místa, kde vznikají metastázy predilekčně. Jedním z nejčastějších je velké omentum, především v oblasti tzv. „milky spots“. Cestou šíření buněk

je průnik nádorových buněk skrz „milky spots“ a stomaty přímo do subperitoneálního lymfatického systému a místa kde se peritoneální tekutina vstřebává.

Adhese nádorových buněk k mezotelu je umožněna over-expresí adhesních molekul na peritoneu, která je odpovědí na přítomnost zánětlivých mediátorů (IL1, TNF α , IL6, IFN γ , EFN). Na invazi do subperitoneálního prostoru se podílí metalo-proteinázy (MMP1, 2, 7). MMP1 působí na kolagen I a III, zatímco MMP2 na kolagen IV, laminin a fibronectin. To umožňuje destrukci basální membrány.

Vznik peritoneálních metastáz je důsledkem interakcí mezi nádorem a organismem, kdy vzniká v dutině peritoneální specifický mikro-ekosystém, který se skládá ze 4 složek (5)

- peritoneální dutina obsahuje tekutinu, v které jsou polymorfonukleáry, makrofágy, NK buňky, lymfocyty a nádorové buňky buď ve formě izolovaných buněk, nebo clusterů
- mesotel, který kryje basální membránu.
- Stroma – intersticiální matrix obsahující kolagenní vlákna, proteoglykany a fibronectin
- Cévy – lymfatické i krevní. V důsledku nádorem indukované angiogeneze dochází k množení lymfatických i krevních cév a to může podporovat hematogenní i lymfogenní diseminaci

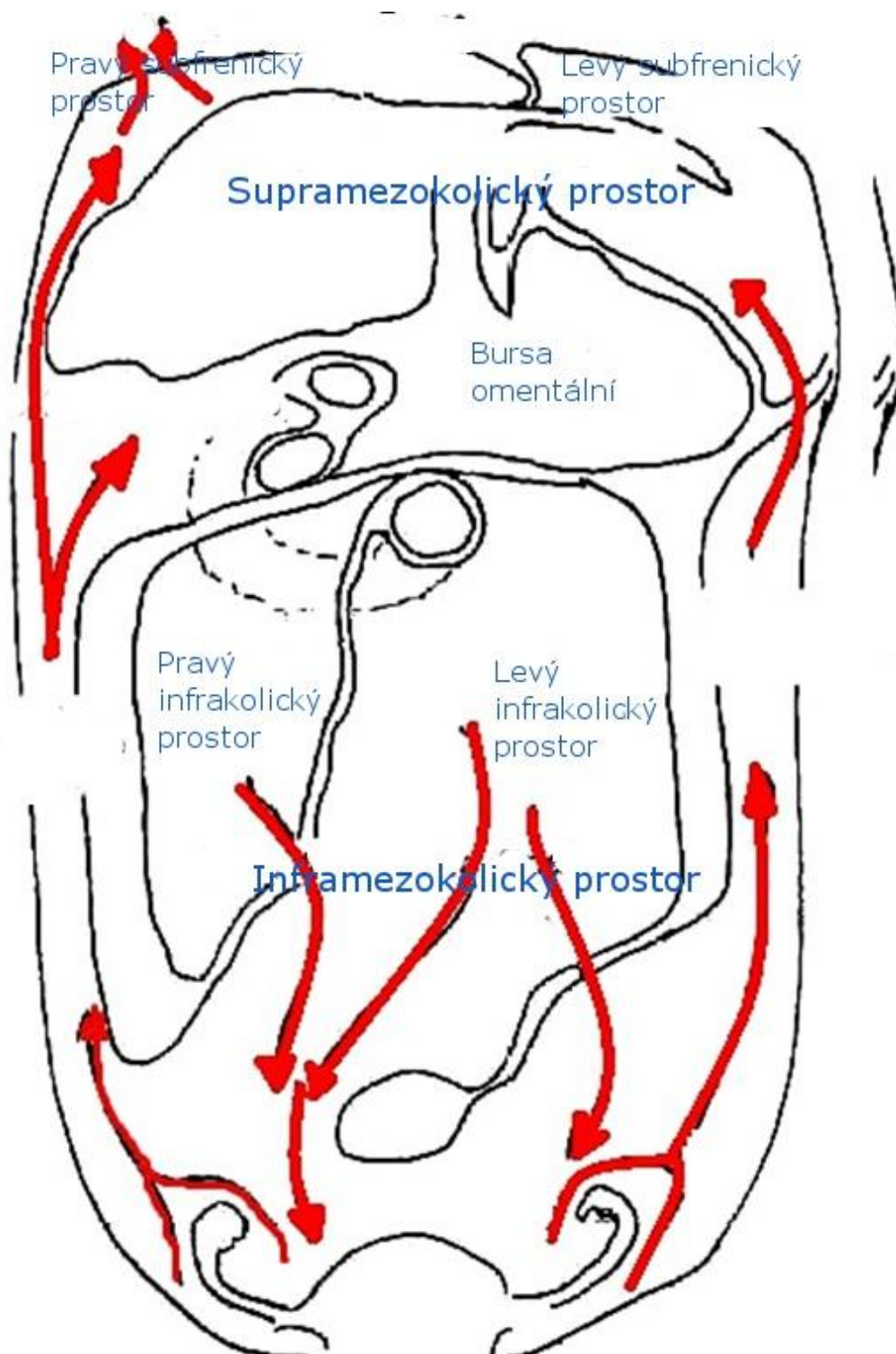
I když ne všechny buňky uvolněné z nádoru jsou schopné vytvořit metastázy, peritoneum pro nádorové buňky představuje „živnou půdu“. Experimentálně bylo ověřeno, že podání stejného množství nádorových buněk intravenózně, intraperitoneálně a intraportálně vede k vzniku stejného počtu plicních a jaterních metastáz, ale vzniká 100x vyšší počet peritoneálních metastáz (10 milionů buněk → 10 jaterních metastáz, 10 plicních metastáz a 1000 peritoneálních metastáz). Ještě lepší podmínky pro růst nádorových buněk představuje jizva na peritoneální membráně (5, 9).

1.6.2 Intraperitoneální tekutina

Za fyziologických podmínek se v dutině břišní vyskytuje malé množství neustále cirkulující tekutiny (20 – 100 ml). Tekutina vzniká transudací z plazmy a vstřebává se otevřenými „stomaty“ v peritoneální membráně.(1) Cirkulaci tekutiny umožňuje pohyb bránice a střevní peristaltika. Tekutina směřuje pravým parakolickým prostorem vzhůru do subfrenia, kde je z 90 % resorbovaná do subperitoneálního lymfatického systému. (Obr. 6)

Obr. 6

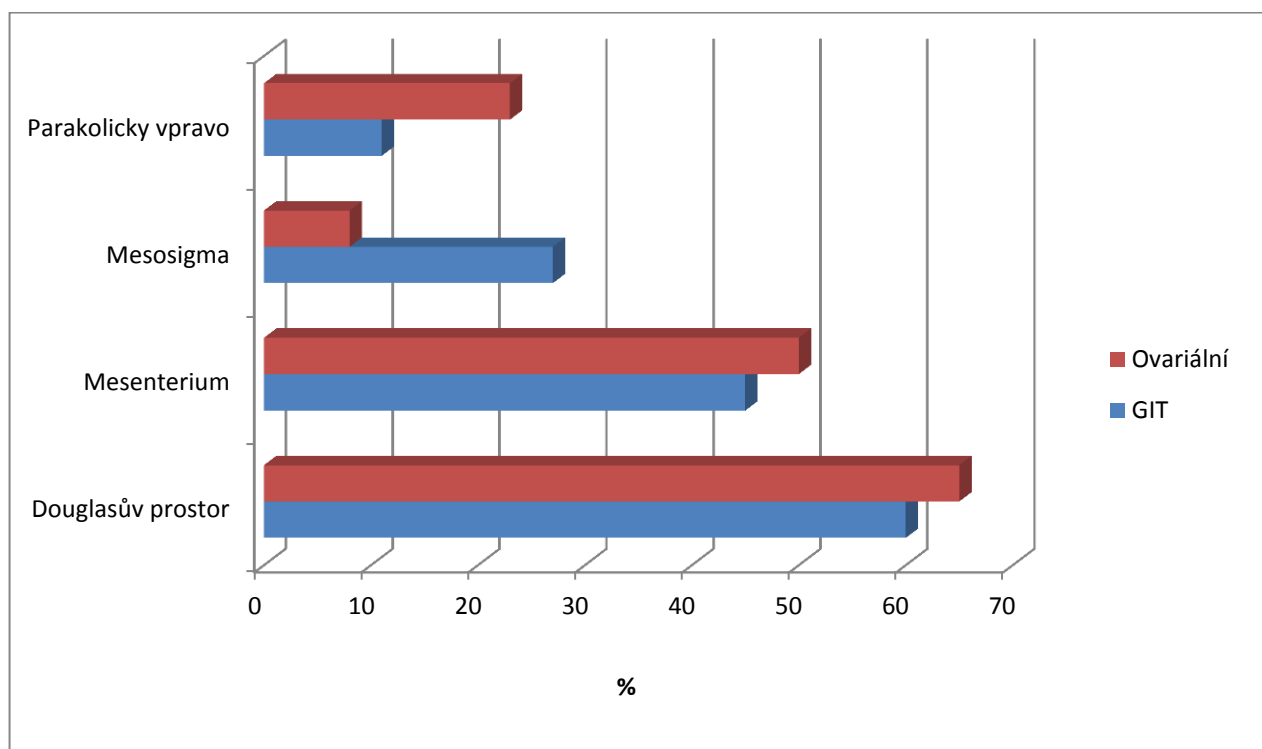
Schéma cirkulace peritoneální tekutiny (upraveno podle Debois J. M.: The Anatomy and Clinics of Metastatic Cancer, 2002 Kluwer Academic Publisher, ISBN: 0-306-47678-9)



V zásadě lze konstatovat, že vlivem gravitace intraperitoneální tekutina směřuje kaudálně, zatímco změny intraabdominálního tlaku při dýchání umožňují pohyb tekutiny směrem k bránicím. V dutině břišní je několik prostorů, kde má peritoneální tekutina tendenci ke stáze – ileocekální přechod, kořen mesosigmatu a Douglasův prostor. V těchto místech (a v oblasti bránice, kde dochází k vstřebávání) také predilekčně vznikají peritoneální metastázy (1) (Graf 8)

Graf 8

Frekvence postižení peritoneálních prostorů u gastrointestinálních a ovariálních karcinomů (podle Debois J. M.: The Anatomy and Clinics of Metastatic Cancer, 2002 Kluwer Academic Publisher, ISBN: 0-306-47678-9)



2 Hypotéza a cíle práce

Nález volných nádorových buněk a/nebo elevace hladin onkomarkerů v peritoneální dutině predikuje vznik intraperitoneální recidivy nádoru. Tyto nálezy lze použít v rozhodování o indikaci HIPEC

1. Nalezení časného markeru peritoneální diseminace nádoru
2. Zjistit, zda je tento marker použitelný pro indikaci hypertermické intraoperační cytostatické laváže (HIPEC).
3. Stanovit význam volných nádorových buněk a hladiny onkomarkerů (CEA, Ca 19-9) v peritoneální tekutině pro určení prognózy onkologických nemocných a rizika peritoneální recidivy a diseminace.
4. Stanovit senzitivitu a specifčnost těchto vyšetření.
5. Posoudit význam určení senzitivity a specifčnosti pro stanovení stadia a prognózy onemocnění.
6. Ověřit význam uváděné vysoké senzitivity RT PCR pro diagnostiku volných nádorových buněk.
7. Zjistit, zda je možné výše uvedené markery použít k časné diagnostice peritoneální recidivy (v čase, kdy ji ještě nelze zjistit standardními zobrazovacími metodami).
8. Zjistit jaký vliv má aplikace HIPEC na další průběh choroby.

3 Materiál a metoda

Přítomnost nádorových buněk v peritoneální dutině v průběhu operace je považována jako jeden z nejspolehlivějších indikačních faktorů peritoneální rekurence. Proto je důležitá detekce těchto buněk v průběhu operace. Standardně se provádí u ovariálních karcinomů. U nádorů trávicího traktu je využívána spíše ve východoasijských zemích. Nicméně metoda byla testována pro solidní nádory GIT v celé řadě studií jak evropských, tak zaoceánských i asijských.

3.1 Technika odběru

Technika odběru tekutiny na cytologické vyšetření není dosud standardizovaná. Odběr lze provést laparoskopicky i laparotomicky. Využívali jsme postupu doporučeného JRSGC (2). Po otevření dutiny břišní, jsme aplikovali do oblasti epigastria 100 ml fyziologického roztoku a snažili jsme se, aby tekutina pronikla na místa v peritoneální dutině, které jsou známa tím, že se v nich hromadí peritoneální tekutina (obr.6) – především do obou subfrenií, případně i do Douglasova prostoru. Zpětně jsme odebírali 40 – 80 ml, který byl následně zpracován. (20 ml na biochemické vyšetření, ostatní materiál na cytologii) Zásadně aplikace a následný odběr probíhala před jakoukoli manipulací s tumorem. Pokud byl přítomen ascites, bylo odebráno 40 ml na cytologické vyšetření a 20 ml ascitu na biochemické vyšetření.

Dále jsme prováděli odběr přímou punkcí břišní dutiny v rámci dispenzární péče po předchozí operaci nitrobřišního nádoru. Cílem bylo zjistit hladinu onkomarkerů případně potvrdit přítomnost volných nádorových buněk a a tím časně diagnostikovat rozsev nádoru po pobřišnici dříve, než je to možné zobrazovacími metodami. K punkci jsme použili obdobný postup, jako při zakládání kapnoperitonea v úvodu laparoskopické operace. Místo vpichu jsme infiltrovali 1% mesocainem. Veresovu jehlu jsme použili, abychom snížili riziko poranění nitrobřišních orgánů při předpokládaných nitrobřišních srůstech po předchozí operaci. Místo vstupu jsme volili obvykle v dolní polovině břicha v dostatečné vzdálenosti od operační jizvy (obvykle ve střední čáře nad sponou). U komplikovaných případů (po vícečetných operacích) jsme zavedení jehly kontrolovali pomocí ultrazvuku. Po zavedení hrotu jehly do dutiny břišní jsme aplikovali 100 ml fyziologického roztoku a počkali 15 - 20 min. Poté jsme tekutinu nechali spontánně vytéci (při neúspěchu jsme použili podtlak) tekutinu z břicha, kterou jsme odeslali na cytologické vyšetření. Obvykle se takto podařilo získat 20 – 50 ml tekutiny. Další postup odesílání a zpracování získaného materiálu byl stejný jako při intraoperačním odběru.

3.2 Cytologické vyšetření

Cytologické vyšetření lavážní tekutiny získané z dutiny břišní je běžně užíváno ve stagingu gynekologických malignit – u ovariálních tumorů od roku 1975, u endometriálního karcinomu od roku 1989. Pro nádory GIT se tato metodika rutině nevyužívá, s výjimkou východoasijských zemí.

3.2.1 Klasické cytologické vyšetření

Materiál získaný při odběru je ponechán bez fixace a zpracován ihned nativně. Získaná tekutina se centrifuguje a zbylý sediment se natírá na sklíčko a barví. Obvykle se užívá barvení hematoxylinem – eosinem, případně PAS nebo barvení podle Papanicolaoua – Giemsky nebo alcianovou modří. Použití různých metod v hodnocení v zásadě nijak

neovlivňuje získané výsledky. V podstatě všechny uvedené techniky barvení se nijak neliší ve výsledcích šetření a indikacích k jednotlivým vyšetřením. Všechny typickým způsobem zbarvují normální i nádorové buňky (jen jinak barevně). My jsme použili barvení MGG (May – Grünwald – Giemsa). Lavážní tekutina v množství 20 – 70 ml byla centrifugována, vzniklý supernatant byl natřen na podkloží skla a po zaschnutí při laboratorní teplotě (5 – 10 minut) barven standardním postupem:

- Sklíčka byla vložena do May – Grünwaldova činidla (0,25%) na 5 minut
- Následně byla vložena do fosfátového bufferu na 90 sekund
- Poté byla barvena ředěným Giemsovým činidlem (0,4% ředěno 1:20 deionizovanou vodou). Zde byla ponechána 15 – 20 minut
- Na závěr byla opláchnuta deionizovanou vodou

Po usušení byl materiál odečítán a hodnocen. Vzorky odečítal zkušený cytopatolog společně s autorem disertace.

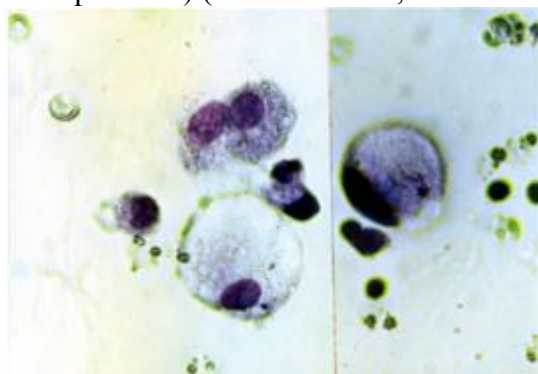
Cytologicky se hodnotí buňky v preparátu (cytospinu): podle četnosti, velikosti, typu cytoplazmy, cytoplazmatických vakuol, jaderných abnormalit, denzity jaderného chromatinu, poměru jádro/cytoplasma, počtu mitóz. Hodnotí se i nález buněčných clusterů (41, 46).

Problémem cytologického vyšetření vzorku tekutiny, získaného peritoneální laváží, může být malý počet buněk v sedimentu, který je někdy příčinou falešně negativního nálezu. Stejně může ztížit hodnocení velká příměs krevních buněk (50).

K zvýšení senzitivity cytologického vyšetření a cílenému průkazu nádoru ve vyšetřovaných buňkách se používá imunohistochemických metod. Využívají se nejrozličnější nádorové znaky – především B72,3, CEA, Ca19 – 9, p53, AUA 1, B 72 ad. (63). Uvádí se též možnost barvení protilátkou HEA – 125. Jde o protilátku, která se váže na glykoprotein plazmatické membrány, a tím umožňuje diferenciaci mezi mezoteliální a nádorovou buňkou (62). Tyto techniky jsme po konzultacích s patologi nepoužili (z důvodů malých zkušeností s hodnocením, dostupnosti a také v některých případech finanční náročnosti)

Obr. 7

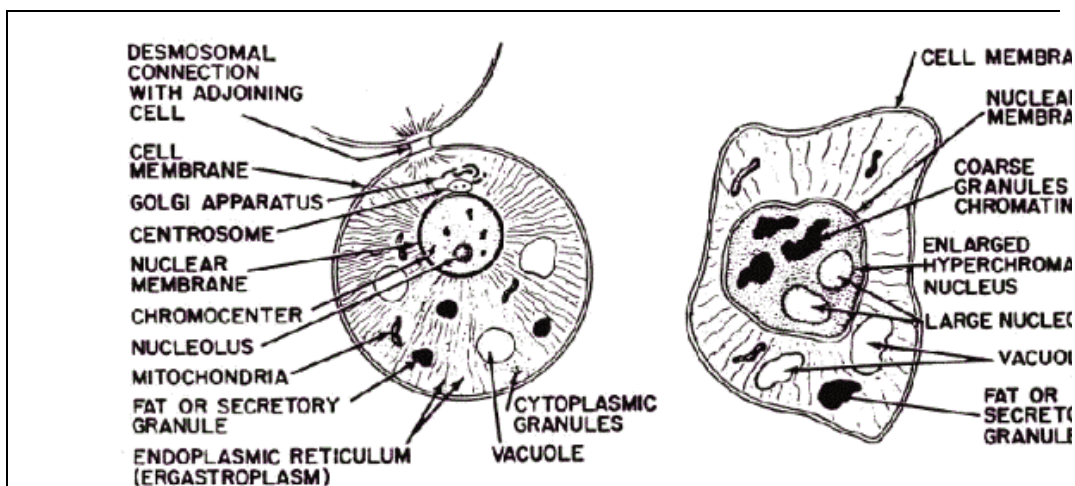
Pozitivní peritoneální cytologie (buňky tvaru pečetiho prstenu s velkým jádrem stačeným do periferie) (Barvení MGG, foto MUDr.Kudrmann, MUDr. Hoskovec)



Nálezy byly hodnoceny jako benigní tam, kde byly nalezeny izomorfní mezotelie (obr. 9), suspektní s přítomností velkých hyperchromních elementů nebo přítomností klastrů a vícejaderných hyperchromních buněk (obr. 10) a jako maligní tam, kde byly nacházeny shluky malých hyperchromních buněk a izolované velké vakuolizované hyperchromní atypie (obr. 11). Pro účely práce i suspektní nález byl hodnocen jako pozitivní. Na obrázku 8 je znázorněno schematicky, jaké nálezy byly posuzovány jako normální a patologické.

Obr. 8

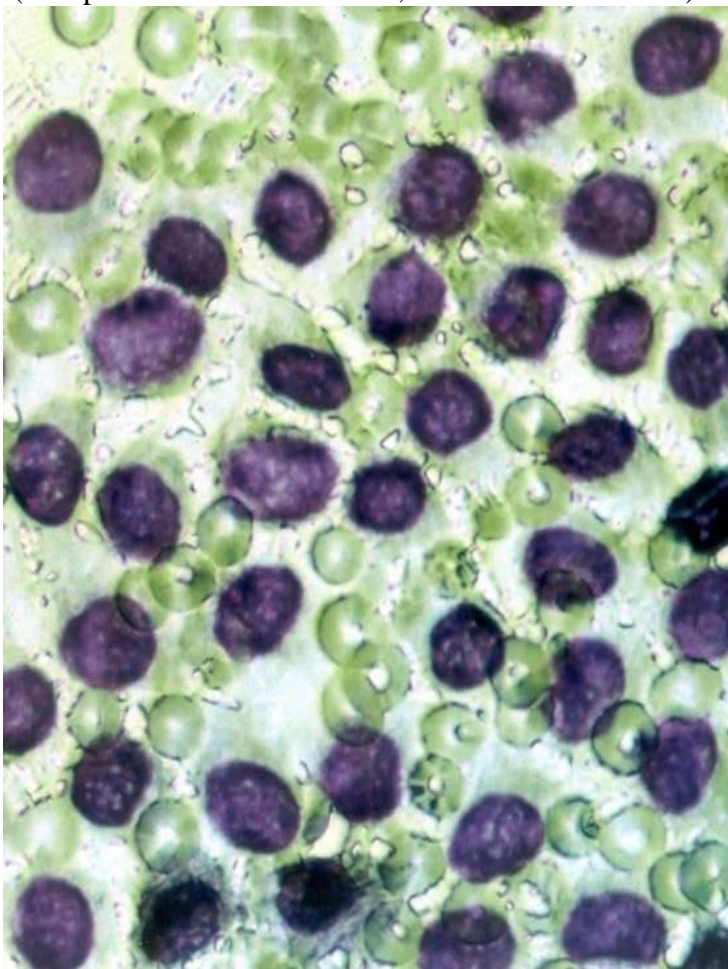
Cytologické rozdíly mezi hypotetickou benigní a maligní buňkou (podle Koss, Leopold G.; Melamed, Myron R: Koss' Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases, 5th Edition, 2006 Lippincott Williams & Wilkins)



	Benigní buňka	Maligní buňka
Velikost	Variabilní ve fyziologických mezích	Variabilní mimo fyziologické rozmezí
Tvar	Variabilní ve fyziologických mezích	Nepravidelný
Velikost jádra	Podle fáze buněčného cyklu	Výrazně rozdílná
Poměr jádro cytoplasma	Ve fyziologických mezích	Převaha jádra
Tvar jádra	Sférický, oválný, fazolovitý	Aberace tvaru a velikosti
Chromatin	Transparentní	Kontrastní
Hyperchomasie	Vzácná	Častá
Jadérka	Malá, oválná, limitovaný počet	Zvětšená, různých tvarů
Počet mitóz	Pouze pro replikaci	Zvýšený
Mitózy	Bipolární	Aberantní formy

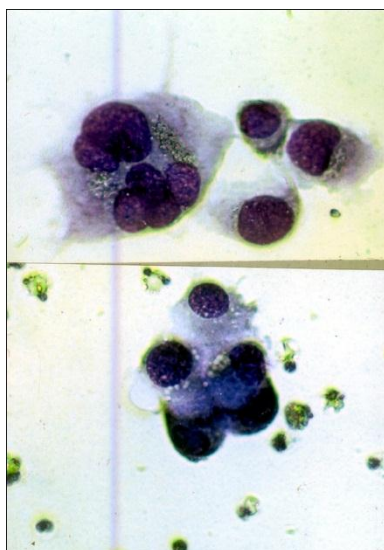
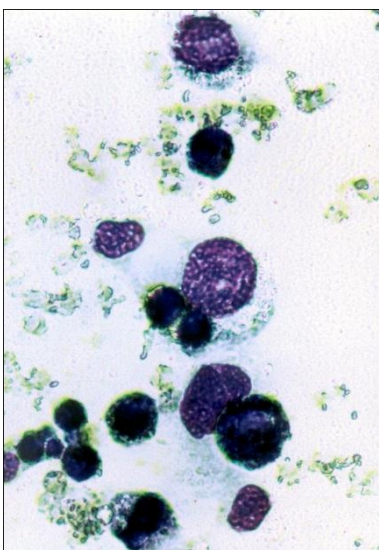
Obr. 9

Cytologie – benigní nález (nekohezní monolayer středních isomorfních mezotelií)
(MGG) (foto prim. MUDr. Kudrmann, as. MUDr. Hoskovec)



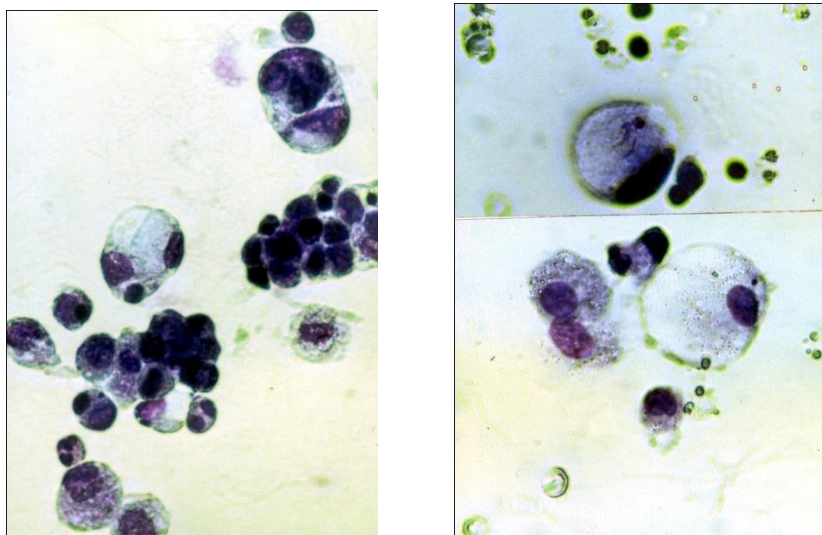
Obr. 10

Cytologie – suspektní nález (Velké hyperchromní izolované elementy, vícejaderné buňky a klastry)(MGG)(foto prim. MUDr. Kudrmann, as. MUDr. Hoskovec)



Obr. 11

Cytologie – maligní nález (Shluky malých hyperchromních buněk, izolované velké vakuolizované atypie) (MGG) (foto prim. MUDr. Kudrmann, as. MUDr. Hoskovec)



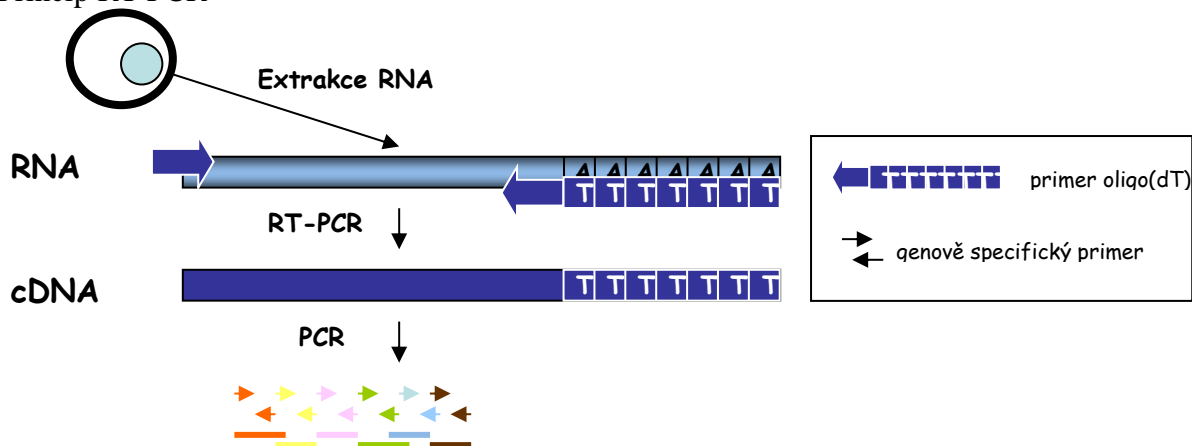
3.3 Vyšetření RT PCR (Revers transskripcí – polymerase chain reaction)

PCR – polymerase chain reaction – byla vyvinuta v roce 1985 v Kalifornii. Principem metody je enzymatická amplifikace DNA in vitro syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích (denaturace, hybridizace a syntéza komplementárního úseku DNA)

RT PCR – PCR metodou reversní transkripce – je metoda určená k amplifikaci RNA. Ta nemůže sloužit jako templát (matrice) pro PCR a proto je nejprve převedena do cDNA (complementary DNA) retrovirovou transkriptázou (42, 43, 65).

Obr. 12

Princip RT PCR



Vzhledem k tomu, že klasické vyhodnocení obou typů PCR (viz výše), je časově velmi náročné (řada hodin), byly vyvinuty techniky tento proces urychlující. Tzv. real time PCR umožňuje přímou kvantifikaci produktu v reálném čase. Detekce produktů reakce je umožněna využíváním fluorescenčních molekul, které odpovídají množství amplifikované DNA v každém cyklu. Metoda je založena na klasickém PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu (u klasického PCR se detekuje až finální produkt). Real-time PCR se provádí s pomocí přístrojů zvaných cyclery, které umožňují jak provádění teplotního cyklování, tak detekci fluorescence v každém cyklu PCR.

Jednotlivé kroky RT PCR (20):

1. izolace celkové RNA
2. stanovení koncentrace a kvality RNA
3. zpětný přepis do cDNA
4. preamplifikační reakce (zmnožení cDNA)
5. RT PCR
6. Analýza dat

K detekci nádorových buněk se nejčastěji používá CEA, respektive specifický oligonukleotid 5'-AACTTCTCCTGGTCTCTCAGCT (sense primer) a 5'-GCAAATGCTTTAAGGAAGAAG (antisense primer), které identifikují sekvenci M/3' exonu a 3' exonu genu kódujícího CEA. Další možností je identifikace MMP7, kde jako sense primer slouží sekvence 5'-ATGTTAAACTCCCGCGTCATA-3' a antisense primer je sekvence 5'-CAGCATACAGGAAGTTAATCC-3'. (20)

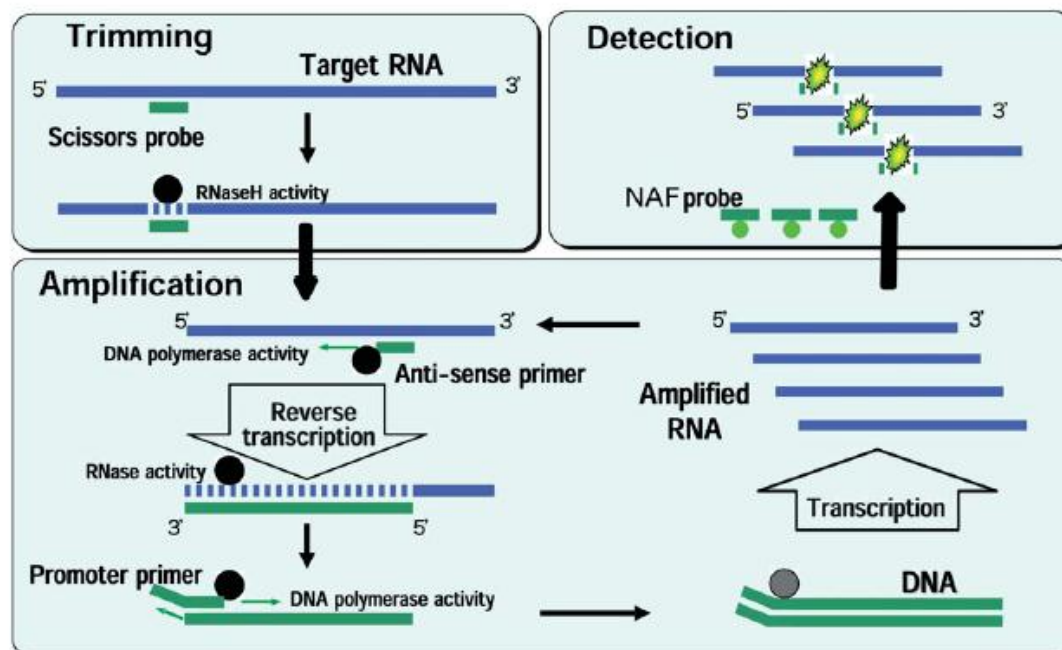
Určité riziko představuje falešná pozitivita RT PCR. Ta může být na podkladě exprese sledované RNA nenádorovou buňkou, nebo na podkladě vysoké citlivosti metody, kdy detekuje klinicky nevýznamné počty buněk.

Obr. 13

Schéma RT PCR (Fujiwara Y. et al: Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity)

Y. Fujiwara et al.: Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity

201



Technika RT PCR byla zvolena ke zvýšení senzitivity a specifity vyšetření peritoneální laváže. Odběr k vyšetření na RT PCR probíhal bezprostředně po otevření dutiny břišní. Odebraná tekutina byla ihned inokulována do RNA stabilizačního roztoku (RNA lyteru).

Postupně byly vyzkoušeny 3 komerčně využívané sety.

Quiagen

Tekutina byla stabilizována v RNA lyteru v poměru 1 ml odebrané laváže na 10 ml RNA stabilizačního roztoku. Odebírán byl vzorek 2x1 ml, který byl uložen do 2 zkumavek s RNA lyterem (vzorek A a B). Zkumavky byly bezprostředně po odběru uloženy do chladicího zařízení při teplotě -20°C a nejpozději do týdne přepraveny k definitivnímu zpracování. Při této teplotě je garantována neměnost vzorku 4 a více týdnů. Zpracována byla vždy polovina odebraných vzorků (vzorky A), vzorky B byly ponechány ke kontrolní analýze.

Promega

Odebraná tekutina byla stabilizována v roztoku RNA lyteru v poměru 2ml vyšetřované tekutiny: 5 ml RNAlyteru – opět byly odebrány 2 vzorky (A a B), každý vzorek obsahoval 28 ml směsi. Bezprostředně po odběru byly vzorky centrifugovány a centrifugát stabilizován 95% alkoholem. Poté byly vzorky uloženy při teplotě -80°C a do 2 týdnů dopraveny k definitivní analýze. Vzorky B byly opět ponechány ke kontrolním analýzám.

Eppendorf

Vzorky byly odebrány v poměru 1 ml tekutiny : 1 ml RNA lyteru v celkovém množství 20 ml, uchovány při teplotě -8°C a zpracovány do týdne. Stejně jako v předchozích případech i zde od každého nemocného byly odebrány 2 vzorky označené A a B

Transport vzorků

Transport vzorků probíhal po předchozím telefonickém ohlášení automobilem v Dewarově nádobě na Ústav patologické fyziologie 1. LF UK, kde byly vzorky dále zpracovány.

Vzorky A byly zpracovány dle doporučení výrobců jednotlivých kitů, nejprve bylo provedeno ověření přítomnosti RNA, její kvality a stupně degradace. Teprve poté měla být provedena RT PCR analýza zaměřená na přítomnost nádorové RNA – CEA a jejího specifického oligonukleotidu 5'-AACTTCTCCTGGTCTCTCAGCT (sense primer) a 5'-GCAAATGCTTTAAGGAAGAAG (antisense primer).

3.4 Biochemické vyšetření

Kromě cytologického vyšetření je k detekci mikroskopické peritoneální diseminace používáno stanovení hladin onkomarkerů v lavážní tekutině – především CEA. Studií věnovaných této problematice je však řádově méně než prací, které jsou věnované cytologii.

V naší práci jsme použili onkomarkery CEA a Ca 19-9. 20 ml tekutiny získané při operaci bylo bez fixace dopraveno biochemické laboratoře a vyšetřeno metodou ELISA ke kvantitativnímu stanovení hladiny CEA

Hladina 19-9 byla založena na reakci antigenu s monoklonální protilátkou (NS 1116 19-9) získané imunizací lidskou linií kolorektálního karcinomu SW 1116.

Jako referenční hodnoty pro oba markery byly použity hodnoty platné pro vyšetření v séru. CEA bylo hodnoceno jako negativní při hodnotách 0 – 4,6 µg/l, Ca 19 – 9 bylo negativní při hodnotách 0 – 37 U/ml.

3.5 Hodnocený soubor probandů

V rámci projektu vyhledání vhodných indikátorů pro časnou aplikaci HIPEC u nemocných s maligním nádorem GIT jsme v letech 2003 – 2009 na Chirurgické klinice 1. LF UK a IPVZ FN Na Bulovce Praha vyšetřovali u nemocných operovaných pro podezření na malignitu žaludku, pankreatu, biliárního traktu a u nemocných s gastrointestinálním stromálním tumorem tekutinu z peritoneální dutiny získanou laváží dutiny břišní (případně ascites) cytologicky, biochemicky a metodou PCR. Uvedené nádory byly zvoleny pro své biologické charakteristiky, agresivní chování, tendenci k vzniku lokoregionálních nebo intraperitoneálních metastáz a tím, že účinně nereagují na konvenční onkologické postupy. Předpokládali jsme, že identifikace vhodného markeru rizika peritoneálního rozsevu napomůže k indikaci HIPEC. Včasné zařazení této techniky do terapeutického algoritmu by mohlo zlepšit prognózu těchto nemocných jak s ohledem na dobu přežití, tak z hlediska kvality života.

3.5.1 Charakteristika souboru

Do souboru sledovaných jsou zahrnuti pacienti operovaní v letech 2003 – 2009 pro podezření na maligní onemocnění žaludku, pankreatu a biliárního traktu a pacienti s gastrointestinálními stromálními tumory. (Tab 7) U všech bylo provedeno vyšetření lavážní tekutiny z dutiny břišní (event. ascitu) při prvotním operačním výkonu, revizní operaci nebo při kontrole punkcí břicha, pokud nebyla indikována revizní operace. Celkem bylo vyšetřeno 220 nemocných cytologicky, 165 biochemicky a 50 metodou RT PCR. U některých pacientů bylo vyšetření peritoneální tekutiny provedeno opakovaně (kontroly). Všichni nemocní byli seznámeni s cílem výzkumu a podepsali informovaný souhlas schválený Etickou komisí FN Na Bulovce.

Zastoupení jednotlivých diagnóz udává tabulka.

Tab. 7:

Rozdělení souboru dle diagnóz

Dg	Muži	Ženy	Celkem
Karcinom žaludku	57	48	105
Karcinom pankreatu	49	32	81
Karcinom žlučových cest	6	12	18
GIST	9	7	16
Celkem	121	99	220

Podrobnější rozdělení souboru je uvedeno dále.

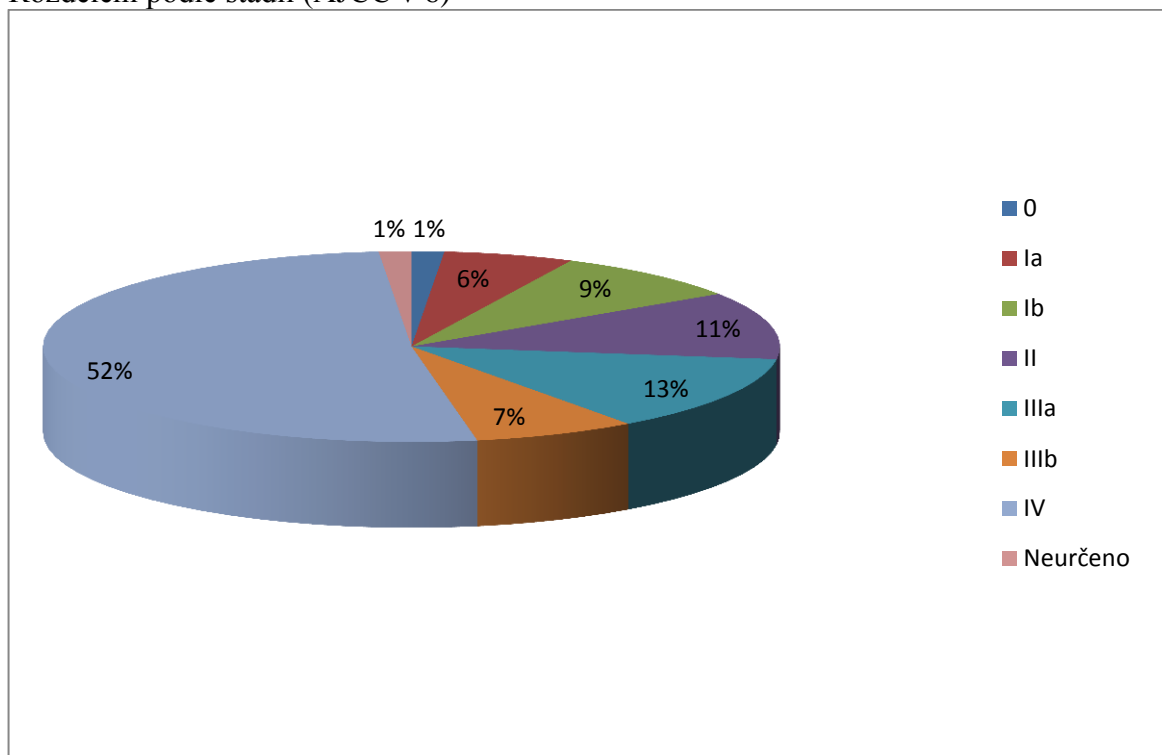
3.5.2 Karcinom žaludku

Pacientů s karcinomem žaludku bylo vyšetřeno 105. Zastoupena byla všechna stadia, největší počet byl ve stadiích III a IV, která představovala téměř $\frac{3}{4}$ souboru. (Tab. 8, Graf 9, 10)

Tab. 8
Demografická data

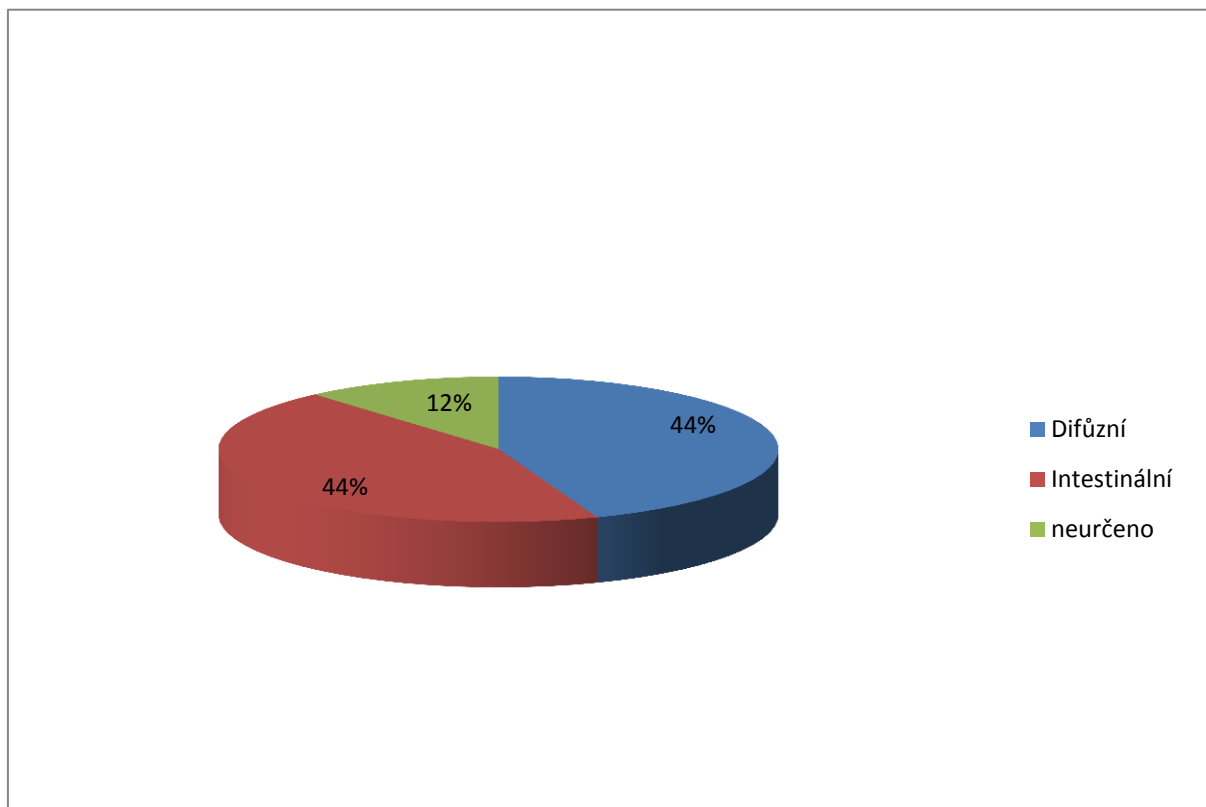
	Muži	Ženy
Počet	57	48
Průměrný věk	68	61
Věkové rozmezí	40 - 87	33 - 91

Graf 9
Rozdělení podle stadií (AJCC v 6)



Graf 10

Zastoupení jednotlivých typů nádorů



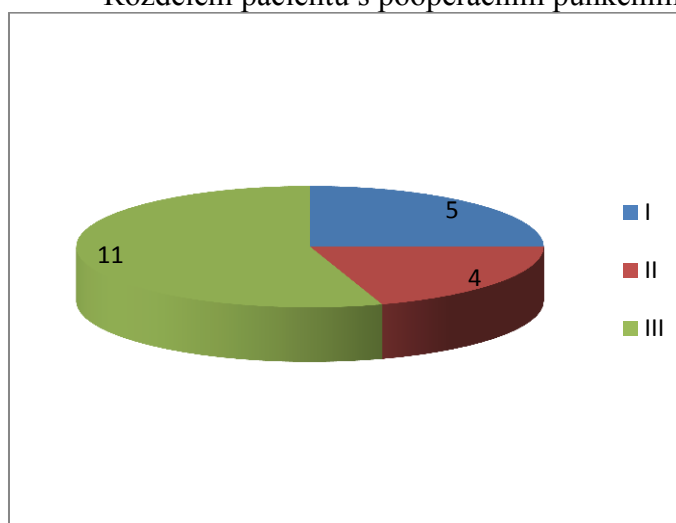
Ve skupině s difúzním karcinomem výrazně převažovaly ženy (29 : 18), ve skupině s intestinálním karcinomem byl poměr ženy : muži obrácený (15 : 31). Ve skupině neurčených karcinomů bylo 8 mužů a 4 ženy.

Pacienti s difúzním karcinomem byli mladší (průměrný věk 58 let) než pacienti karcinomem intestinálním (průměrný věk 70 let).

Vyšetření lavážní tekutiny získané punkcí peritoneální dutiny po 0,5 -1 roce po operaci podstoupilo 19 pacientů ve stadiích I – III. (Graf 11) U stadia IV jsme vyšetření nepovažovali za přínosné, protože generalizace nádoru u nich již byla prokázána.

Graf 11

Rozdělení pacientů s pooperačním punkčním vyšetřením dle stadií



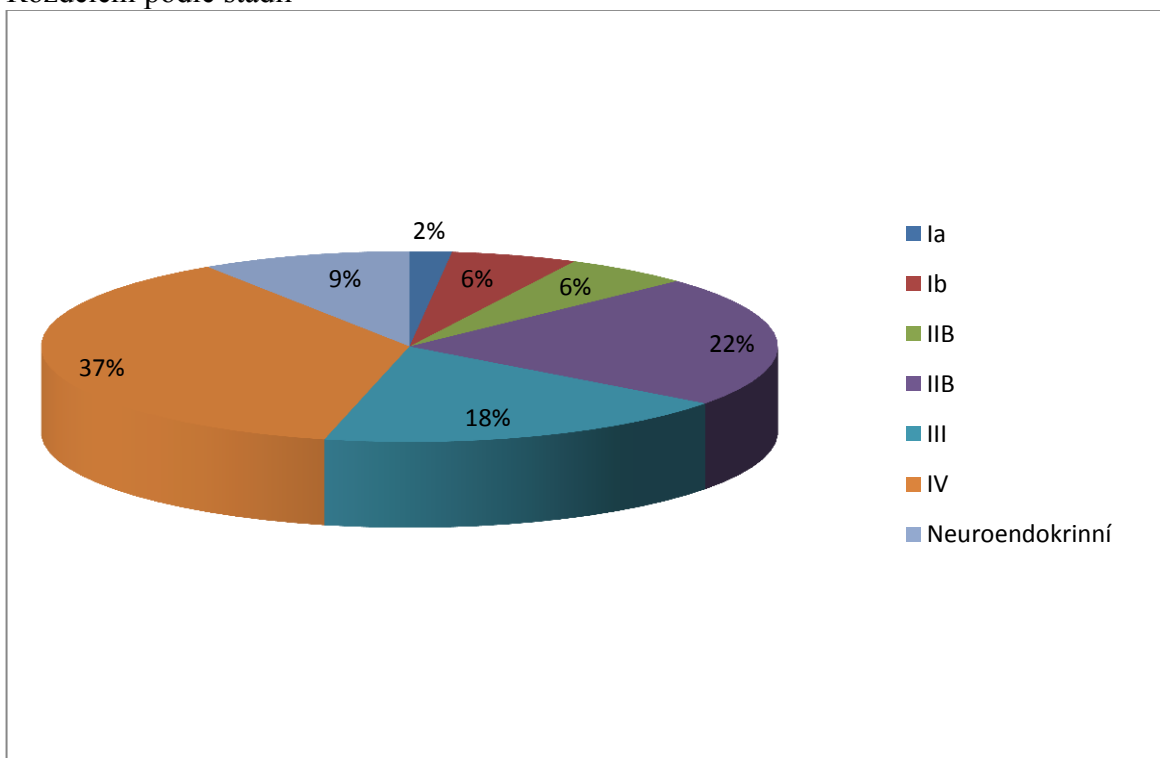
3.5.3 Karcinom pankreatu

Pacientů s tumory pankreatu bylo 81. V 75 případech šlo o klasický duktální adenokarcinom, 6x byl histologicky zjištěn neuroendokrinní tumor. Opět převažují nádory stadia III a IV – více než 50 % souboru. (Tab. 9, Graf 12)

Tab. 9
Demografická data

	Muži	Ženy
Počet	49	32
Průměrný věk	65	64
Věkové rozmezí	51 - 83	48 - 77

Graf 12
Rozdělení podle stadií



Pooperační vyšetření tekutiny z punkční laváže peritoneální dutiny po 0,5 -1 roce po operaci bylo provedeno u 6 nemocných stadia I – III. (Stadium I – 1 pacient, stadium II – 3 pacienti, stadium III – 2 pacienti). Nízký počet pacientů je způsoben tím, že u řady nemocných již v době plánované pooperační punkce byla jinými diagnostickými metodami zjištěna recidiva.

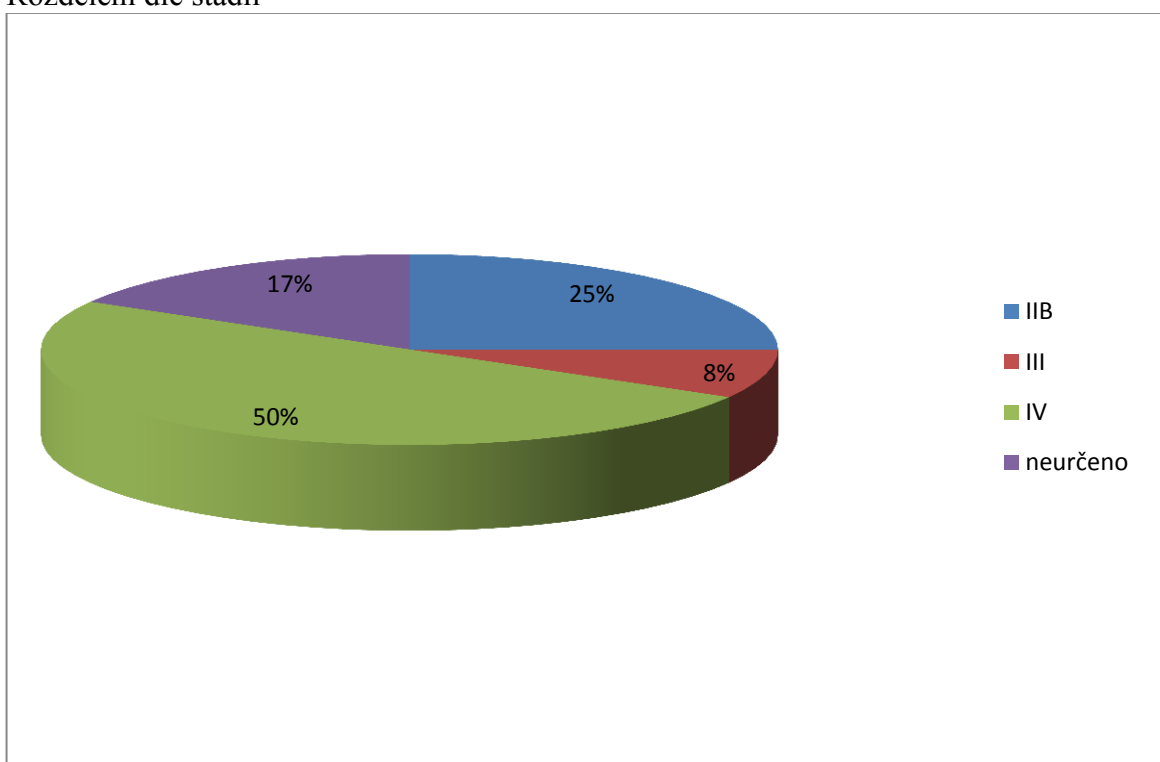
3.5.4 Nádory žlučového stromu

Bylo vyšetřeno celkem 18 nemocných. Stejně jako v předchozích skupinách převažují prognosticky nepříznivá stadia. Navíc tato skupina nemocných má nejvyšší průměrný věk. (Tab 10, Graf 13)

Tab. 10
Demografická data

	Muži	Ženy
Počet	6	12
Průměrný věk	64	69
Věkové rozmezí	59 - 74	57 - 79

Graf 13
Rozdělení dle stadií



Pro malý počet nemocných jsme pooperační punkční vyšetření neprováděli.

3.5.5 Gastrointestinální stromální nádory

GISTy nepatří mezi nádory, kde je běžně používáno vyšetření peritoneální cytologie k určení možného nitrobršíšního rozsevu. K zařazení těchto tumorů do studie nás vedla určitá uniformita změn v cytologických nálezech bez ohledu na typ tumoru a dále obvyklé cesty metastázování tohoto nádoru – tendence k vzniku lokoregionálních a peritoneálních metastáz. V současné době jsou pacienti s generalizovaným GIST léčeni imatinibem. Tato léčba nebyla v počátku studie v ČR používána a pro pacienty s generalizací neexistoval účinný terapeutický postup. To nás vedlo k teoretickým úvahám o možném použití HIPEC i u této malignity.

Nádory jsme nejprve klasifikovali podle Amina (Tab. 11), v průběhu studie jsme přešli na podrobnější Fletcherovu klasifikaci. (Tab 12.)

Tab. 11

Aminova klasifikace

	Počet mitóz	Velikost
Benigní	< 5/50 HPF	≤ 5 cm
Bordeline	< 5/50 HPF	> 5 cm
maligní	> 5/50 HPF	Jakákoli velikost

Tab. 12

Fletcherova klasifikace (Riziko agresivního chování tumoru)

	Velikost (největší rozměr)	Počet mitóz
Velmi nízké riziko	< 2 cm	< 5 / 50 HPF
Nízké riziko	2-5 cm	< 5 / 50 HPF
Střední riziko	< 5 cm	6-10 / 50 HPF
	5-10 cm	< 5 / 50 HPF
Vysoké riziko	> 5 cm	> 5 / 50 HPF
	> 10 cm	Jakýkoli počet mitóz

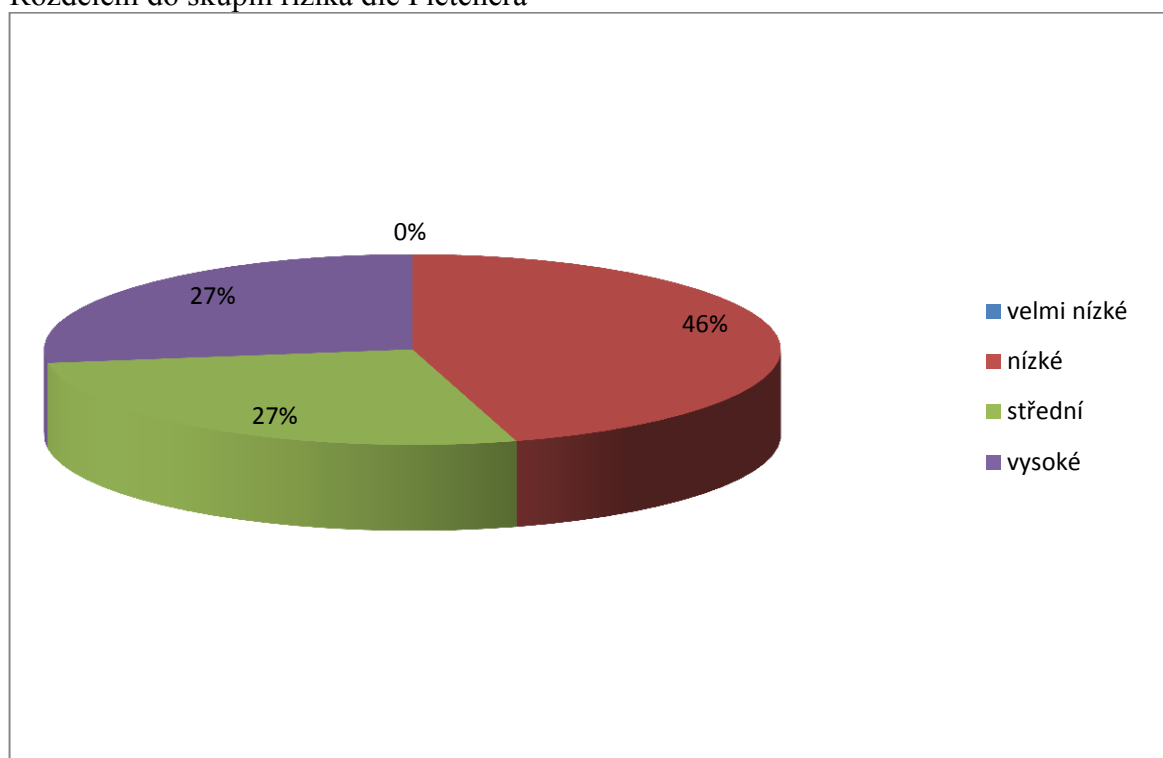
Pacientů s GISTem bylo celkem 16. Rozdělení podle rizika je příznivější než v předchozích skupinách, téměř polovina nemocných byla ve skupině nízkého rizika. (Tab 13, Graf 14)

Tab. 13

Demografická data

	Muži	Ženy
Počet	9	7
Průměrný věk	62	68
Věkové rozmezí	52 - 71	54 - 79

Graf 14
Rozdělení do skupin rizika dle Fletchera



Jak je patrné, většina nemocných byla v nízkém riziku recidivy. Nezaznamenali jsme nález nemocného s velmi nízkým rizikem.

Pro malý počet nemocných jsme pooperační punkční vyšetření neprováděli

3.6 Hypertermická cytostatická laváž

Celkem bylo do konce roku 2012 provedeno ve FN Na Bulovce 223 operačních výkonů doplněných technikou HIPEC. U všech nemocných bylo prokázáno IV. stadium onemocnění. Jednalo se o nemocné, kde byla prokázána generalizace onemocnění po dutině břišní, bez jaterních metastáz a bez známého rozsevu mimo dutinu břišní. V průběhu studie byly také provedeny 4 operační výkony u pacientů s pokročilým karcinomem žaludku, kdy byla provedena resekce, případně peritonektomie + hypertermická cytostatická laváž. U dalších 5 nemocných s pokročilým karcinomem žaludku, kde nebylo možné z technických důvodů provést dostatečný debulking nádoru, byla hypertermická laváž provedena k zabránění tvorby jinak neovlivnitelného ascitu. Vlastní hypertermická laváž probíhala při teplotě 42 - 43°C po dobu 90 minut. Schéma laváže je obr. 14. K zajištění stálé teploty a cirkulace cytostatického roztoku byl použit originální přístroj čs. provenience SKALA LA 1. (Obr. 15)

Laváž byla prováděna polouzavřeným způsobem, kdy jeden z členů operačního týmu zajišťuje manuálním mísením rovnoměrnou distribuci cytostatického roztoku po dutině břišní. Ta je v průběhu laváže provizorně uzavřena speciální neprodyšnou folií se vstupem pro horní končetinu. Kontaminaci okolí zabraňuje kromě této folie také nadzvednutí stěny břišní pomocí speciálního retraktoru. (Obr 16, 17)

V případě resekčního výkonu byla laváž aplikována po dokončení resekce a lymfadenektomie, před rekonstrukční fází operačního výkonu, která následovala bezprostředně

po ukončení laváže. U těchto pacientů následovala ještě uzavřená 5 dní trvající pooperační normotermická cytostatická laváž dutiny břišní.

U pacientů, kde nebyl možný resekční výkon, byla hypertermická cytostatická laváž aplikována bezprostředně po exploraci dutiny břišní a potvrzení rozsahu onemocnění. V těchto případech jsme nepoužívali pooperační laváž.

K laváži byl použit doxorubicin nebo mitomycin C. Přesné dávkování a druh cytostatika určil spolupracující onkolog (prim. MUDr. Vitek, CSc.). Farmakodynamiku obou cytostatik ukazují grafy 15 a 16.

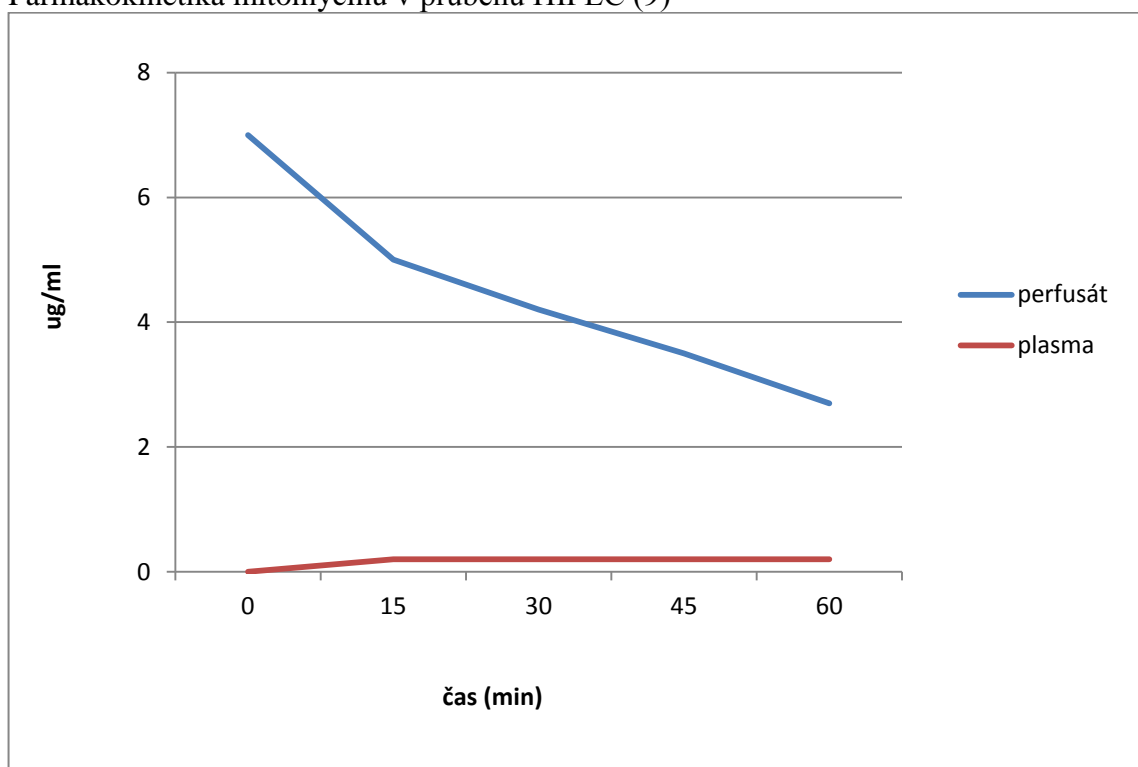
Dávkování a druh cytostatika záviselo na výšce a váze pacienta, výsledků renálních a jaterních funkcí a v případě doxorubicinu na výsledku echografického vyšetření srdce.

Pozitiva intraoperační hypertermické chemoterapie (12, 54):

- teplo zvyšuje penetraci cytostatika do tkání
- teplo zvyšuje cytotoxicitu některých cytostatik
- vyšší teplota sama má protinádorový efekt
- intraoperační aplikace umožňuje rovnoměrnou distribuci cytostatika a tepla po celé dutině břišní a pánvi
- pečlivá monitorace diurézy snižuje renální toxicitu chemoterapie
- délka hypertermie a následné pokračování anestezie umožňuje normalizaci fyziologických parametrů (teplota, koagulace apod.)

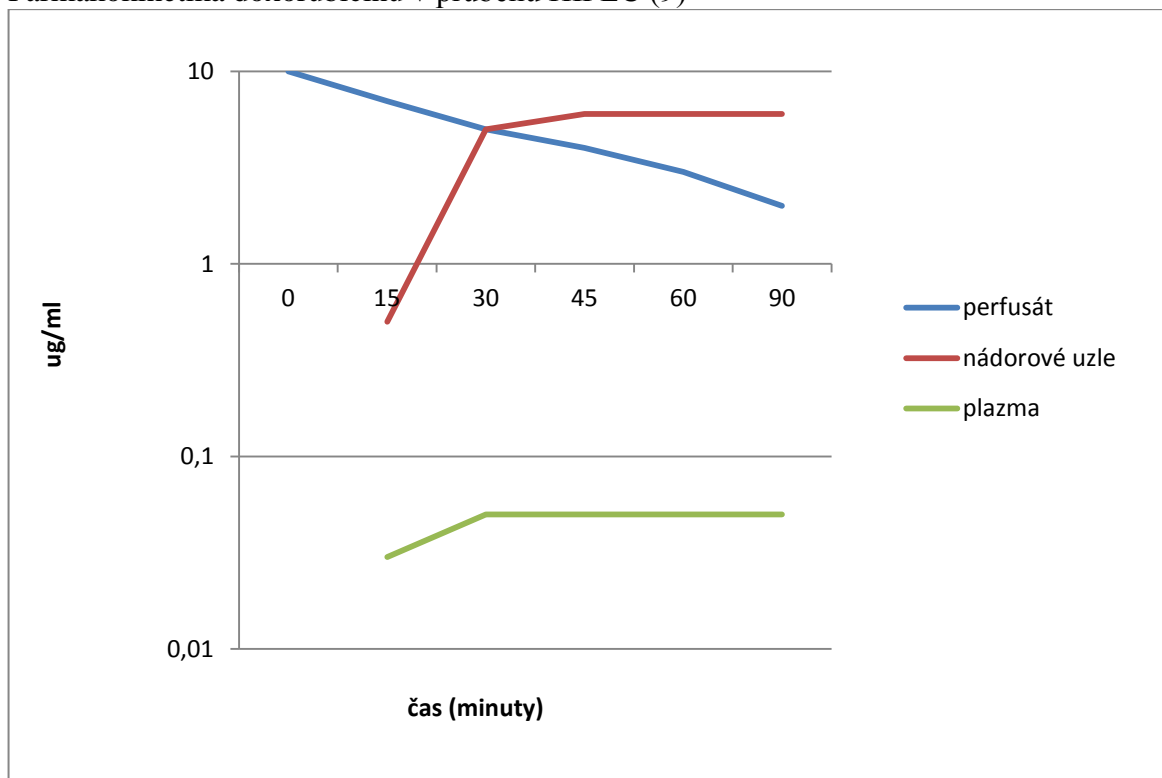
Graf 15

Farmakokinetika mitomycinu v průběhu HIPEC (9)

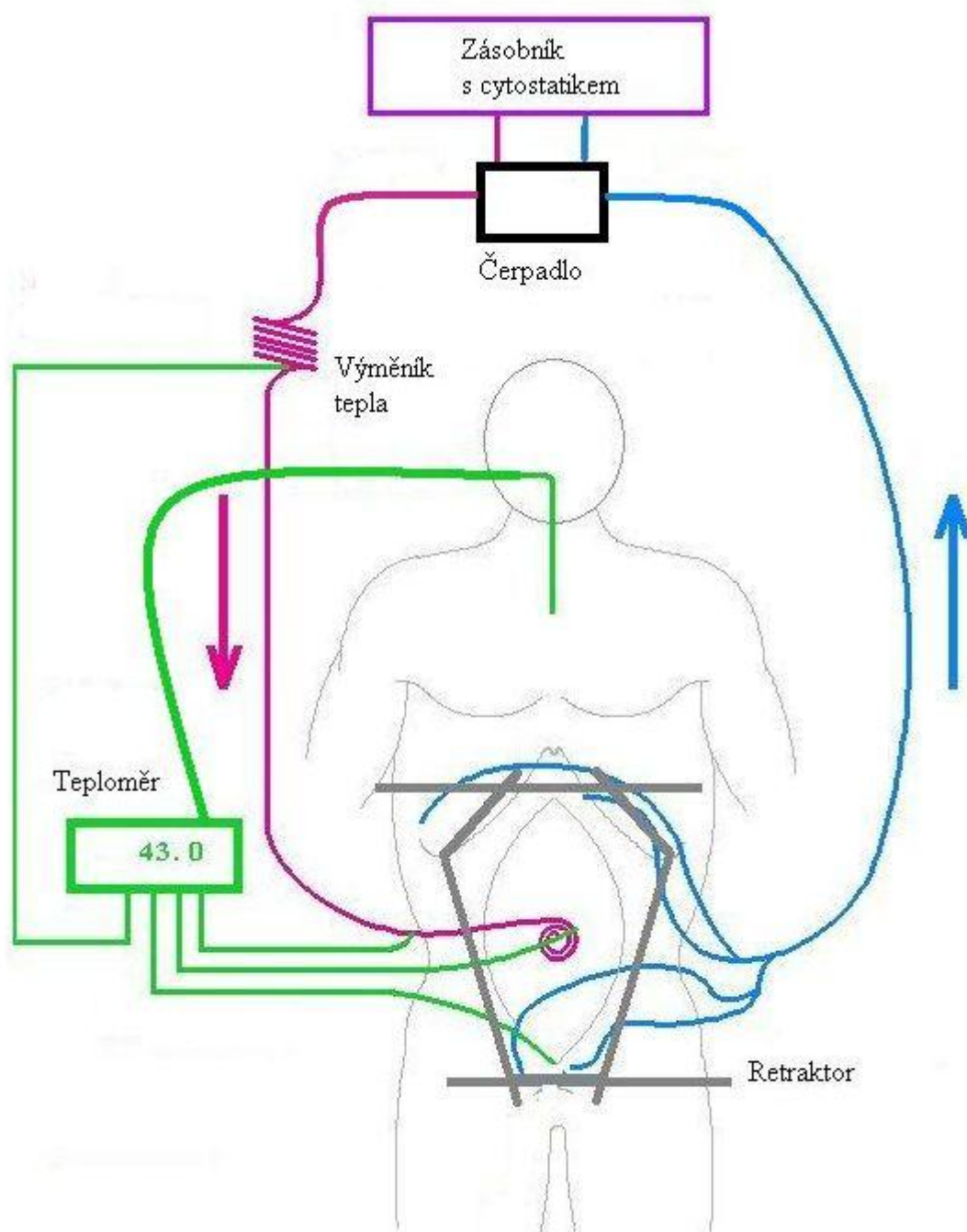


Graf 16

Farmakokinetika doxorubicinu v průběhu HIPEC (9)



Obr. 14
Schéma hypertermické intraoperační terapie (upraveno podle 54)

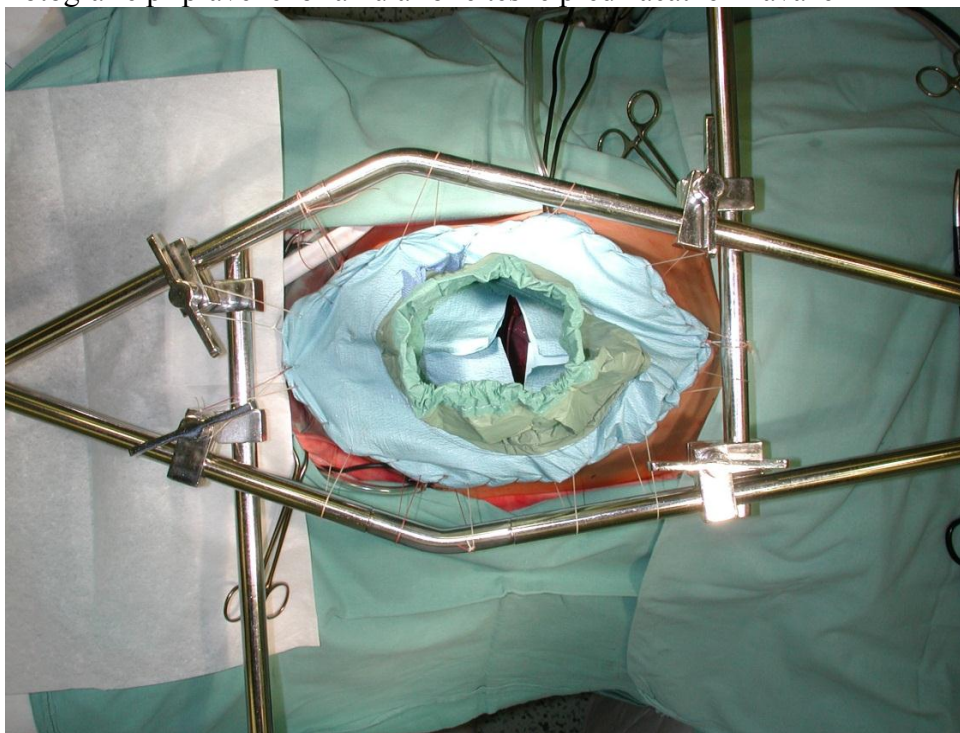


Obr. 15
Originální čs. přístroj k HIPEC



Obr. 16

Fotografie připraveného rámu a folie těsně před začátkem laváže



Obr. 17

Vlastní laváž s manuálním mísením roztoku



3.7 Statistické zpracování

Senzitivita (Se) a specifická (Sp) testů byla vypočítána ze čtyřpolní tabulky podle vzorců $Se = A/(A+c)$ a $Sp = b/(b+d)$.

Přežití jednotlivých skupin nemocných bylo hodnoceno podle Kaplan – Maiera s cenzorováním.

K vyhodnocení statistické významnosti byl použit ANOVA test.

Výpočty byly provedeny statistickým software Statistical Toolbox for Android.

4 Výsledky

Jako první jsme se pokusili určit senzitivitu a specificitu vyšetření. Kontrolní skupina ke kalkulaci těchto hodnot byla vytvořena z nemocných indikovaných k výkonu pro podezření na malignitu (obvykle pankreatu) u kterých nebyl tumor histologicky v resekátu potvrzen. Druhou skupinu tvořili pacienti s generalizací zhoubného nádoru po peritoneu (obvykle karcinom žaludku), kde jsme předpokládali 100 % výskyt maligních buněk v dutině břišní. (Tab. 14 – 16)

Tab. 14
Senzitivita cytologického vyšetření

Cytologie	Peritoneální infiltrace		Celkem
	Lokální (žaludeční stěna)	Vzdálené peritoneální metastázy	
Benigní	20	13	33
Suspektní	4	10	14
Maligní		2	2
Celkem	24	25	49

Tab. 15
Senzitivita biochemických vyšetření

	Peritoneální infiltrace		Celkem
	Lokální (žaludeční stěna)	Vzdálené peritoneální metastázy	
CEA v normě	21	9	30
CEA elevace	2	16	18
Ca 19-9 v normě	18	10	28
Ca 19-9 elevace	5	15	20

Tab. 16
Specifická cytologického a biochemického vyšetření

	Benigní nález (5 nemocných)
Cytologie negativní	4
Cytologie suspektní	1
Cytologie pozitivní	0
CEA norma	5
CEA elevace	0
Ca19-9 norma	5
Ca19-9 elevace	0

Cytologie: negativní cytologické nálezy byly u 33 nemocných s infiltrací peritonea, což odpovídá asi 2/3 ze všech hodnocených případů. Navíc u jednoho z pěti nemocných s benigním onemocněním byla cytologie suspektní z malignity, která se následně neprokázala. Senzitivita cytologického vyšetření byla tedy pouze 34 %, při specifitě 80 %.

Biochemie: provedená biochemická vyšetření byla citlivější. Specifita biochemických markerů byla 100 %. Samotný CEA dosahoval sensitivity 38 % a Ca 19 – 9

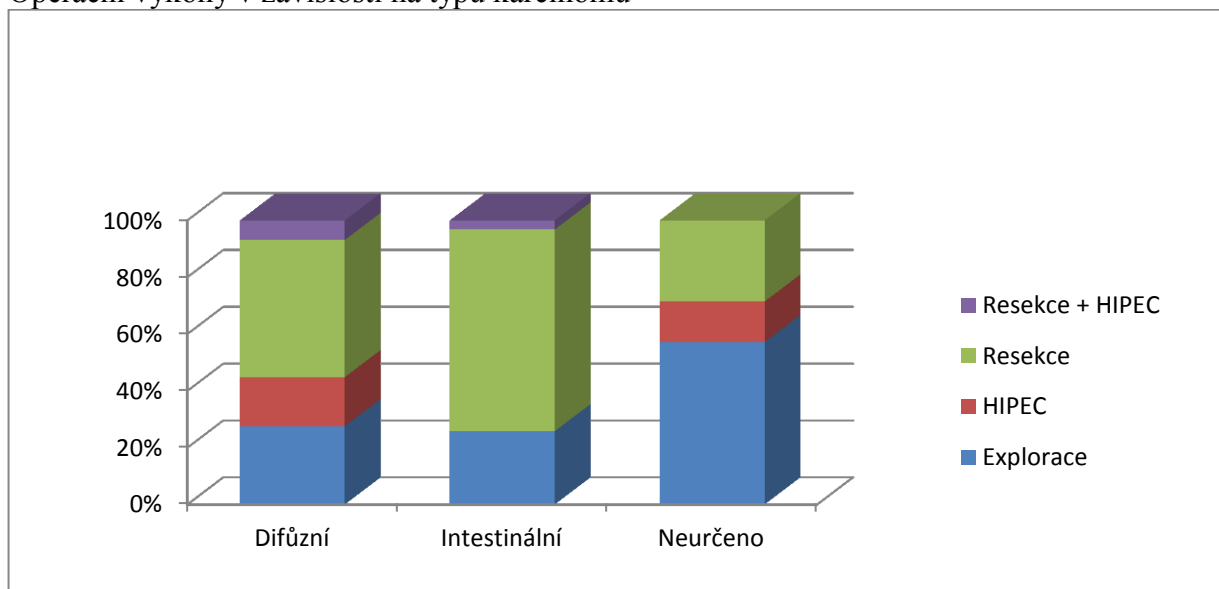
dosáhl 42 %. Při použití kombinace obou markerů (opakovaně jsme zaznamenali elevaci pouze jednoho ze sledovaných onkomarkerů) jsme dosáhli senzitivity 53 %.

4.1 Karcinom žaludku

Pacientů s karcinomem žaludku bylo vyšetřeno 105.

Graf 17

Operační výkony v závislosti na typu karcinomu



Tab. 17

Výsledky cytologického vyšetření

Stadium	Cytologické vyšetření			
	benigní	suspektní	maligní	celkem
0	1			1
Ia	5	1		6
Ib	6	2		8
II	10	2		12
IIIa	12	1		13
IIIb	7	3		10
IV	33	18	3	54
Neurčeno	1			1
Celkem	79	27	3	105

Cytologie: Suspektní cytologické vyšetřena bylo 1x zaznamenáno ve stadiu Ia, 2x ve stadiu Ib a 2x ve stadiu II, což může signalizovat podhodnocení těchto stádií klasickou TNM klasifikací.

Nejčastěji byl suspektní a pozitivní nález ve stádiích III a IV, i když jasná pozitivita cytologického vyšetření byla pouze ve 3 případech. (Tab 17)

Tab. 18
Výsledky biochemického vyšetření

Stadium	Biochemické vyšetření			
	CEA norma	CEA elevace	Ca 19-9 norma	Ca 19-9 elevace
0	1		1	
Ia	6		5	
Ib	8		8	
II	9		7	1
IIIa	12		11	1
IIIb	5	2	5	2
IV	27	24	21	30
Neurčeno	1		1	
Celkem	69	26	58	34

Biochemie: Pacientů s biochemickým vyšetřením je nižší počet, protože toto vyšetření jsme začali sledovat později. Elevaci Ca 19 – 9 jsme zachytili již u stadia II. Ve stadiu III jsme již zaznamenali elevaci CEA a Ca 19 – 9. Opět nejvyšší podíl pozitivních nálezů byl ve stadiu IV. U sledovaných markerů nedocházelo k elevaci shodně, u některých nemocných byly hodnoty zvýšené pouze u jednoho onkomarkeru. (Tab. 18)

Pokud porovnáme shodu cytologického a biochemického vyšetření dojdeme k následujícím výsledkům (Tab. 19)

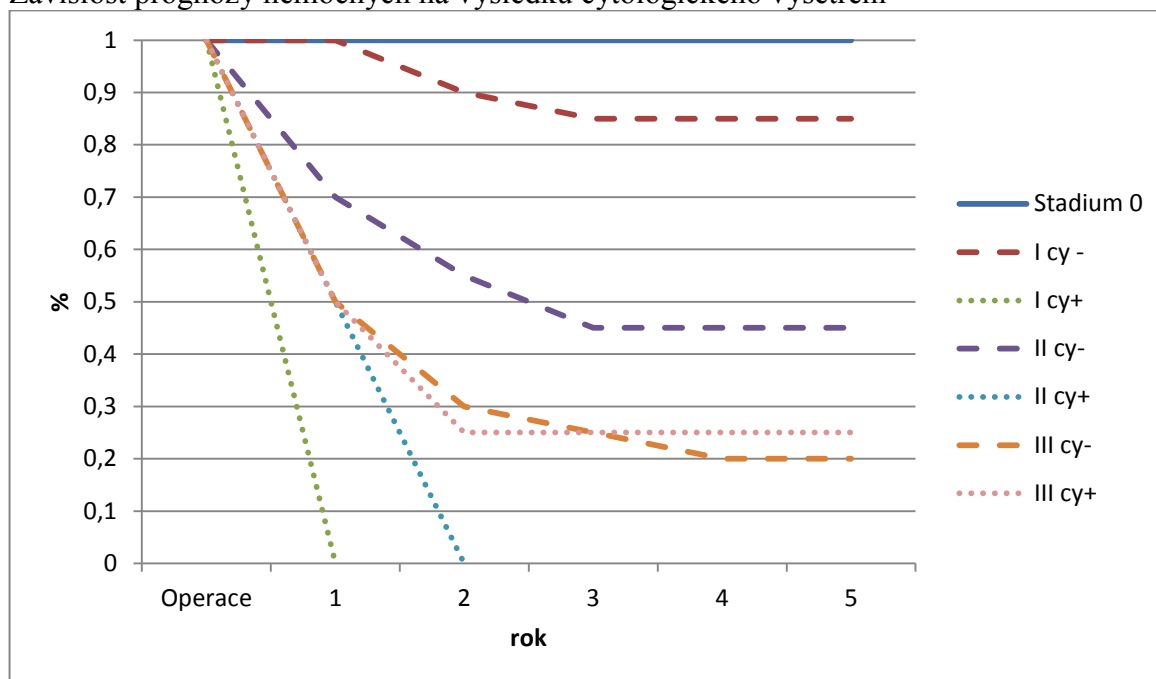
Tab. 19
Srovnání cytologického a biochemického vyšetření

	Biochemie pozitivní	Biochemie negativní
Cytologie pozitivní	16	9
Cytologie negativní	23	45

4.1.1 Závislost prognózy na cytologickém a biochemickém vyšetření

Graf 18

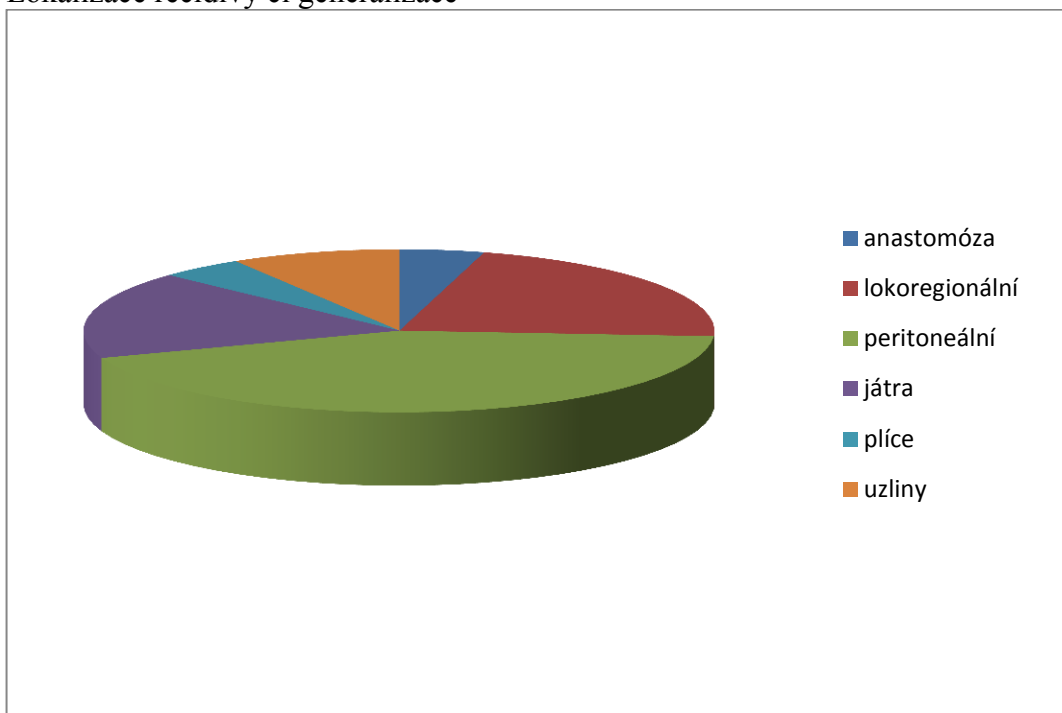
Závislost prognózy nemocných na výsledku cytologického vyšetření



Pacienti s HIPEC nejsou v tomto grafu zahrnuti.

Z grafu plyne, že prognóza pacientů s negativní cytologií je lepší než u těch, kteří jsou cytologicky pozitivní. Nicméně statisticky významný rozdíl jsme zaznamenali pouze u stadia I ($p = 0,002$). U stadia II a III jsme tento rozdíl nepozorovali ($p = 0,425$ pro stadium II a $0,344$ pro stadium III). Tento rozdíl je pravděpodobně způsobený chybou malých čísel. Pokud porovnáme přežití cytologicky negativních nemocných stadia I – III proti stadiu IV (bez ohledu na výsledek cytologie) je zde signifikantní rozdíl ($p = 0,001$). Toto však neplatí pro pacienty stadia I – III s pozitivní peritoneální cytologií. Přežití této skupiny odpovídá přežití nemocných stadia IV ($p = 0,1047$). Tento náález je ve shodě se zahraničními studiemi i novou TNM klasifikací.

Graf 19
Lokalizace recidivy či generalizace



Z grafu 19 je zřejmé, že více než za polovinou terapeutických neúspěchů stojí nádorový rozsev - recidiva lokoregionální a peritoneální. U 8 pacientů se recidiva našla na více místech – obvykle se jednalo o kombinaci lokoregionální a peritoneální recidivy, případně kombinace těchto dvou typů s postižením jater.

4.1.2 Výsledky pooperačních odběrů

Tab. 20

Výsledky pooperačních cytologických odběrů

Stadium	Cytologické vyšetření			
	benigní	suspektní	maligní	celkem
I	4	1		5
II	2	2		4
III	8	2		10
Celkem	14	5	0	19

Tab. 21

Výsledky pooperačních biochemických odběrů

Stadium	Biochemické vyšetření			
	CEA norma	CEA elevace	Ca 19-9 norma	Ca 19-9 elevace
I	5		3	2
II	3	1	2	2
III	7	3	6	4
Celkem	15	4	11	8

Recidiva se objevila u 12 nemocných s pooperačním vyšetřením. Pokud těchto 12 pacientů rozdělíme podle lokalizace dojdeme k následujícím výsledkům. (Tab. 22) U dvou jsme našli jak nitrobršní, tak i další recidivu (1x jaterní, 1x uzlinovou)

Tab 22

Vliv výsledku pooperačního odběru na typ recidivy

	Lokoregionální a peritoneální recidiva	Jiné místo recidivy
Cytologie pozitivní	3	1
Cytologie negativní	4	6
Biochemie pozitivní	6	2
Biochemie negativní	2	4

Výsledky jsou obtížně statisticky reprodukovatelné pro malý počet nemocných. Senzitivita se zdá relativně vysoká (0,4 pro cytologii a 0,75 pro biochemii) specificita je ale velmi nízká (0,1 pro cytologické vyšetření a 0,3 pro biochemické vyšetření). V tomto malém souboru se nepodařilo prokázat závislost výsledku cytologického i biochemického vyšetření na prognóze nemocných – jak z hlediska vzniku eventuální recidivy, tak z hlediska délky přežití.

4.2 Použití HIPEC v léčbě diseminovaného karcinomu žaludku

V průběhu studie bylo ke kombinovanému výkonu doplněného hypertermickou peroperační intraperitoneální chemoterapií indikováno 9 nemocných s karcinomem žaludku (1 pacientka byla operována 2x). Celkově bylo do konce roku 2012 provedeno pro různé diagnózy 223 operačních výkonů doplněných HIPEC. U všech nemocných se jednalo o IV stadia onemocnění s prokázanou generalizací onemocnění po dutině břišní, bez jaterních metastáz a bez známého rozsevu mimo dutinu břišní. Všichni pacienti byli informováni, že jde o experimentální terapii, byli seznámeni s možnostmi a prognózou konvenční onkologické léčby a podepsali informovaný souhlas

U šesti nemocných byl rozsah intraabdominálního postižení tak rozsáhlý, že mohla být provedena pouze explorace a HIPEC s cílem zpomalit růst nádoru a zabránit tvorbě maligního ascitu. U 4 nemocných byl proveden „radikální výkon“ s resekcí, D2 lymfadenektomií a peritonektomií postiženého peritonea a následnou HIPEC. Cílem bylo dosáhnout R1 resekce (nelze předpokládat R0 resekci při šíření nádoru po peritoneu). (Tab. 23)

Z tabulky 23 je patrné, že většina pacientů měla difúzní karcinom, obvykle šlo o ženy a polovina nemocných byla mladší 40 let. V bezprostředním pooperačním období jsme zaznamenali 2 exity (kardiorespirační selhání) a třetí exitus byl po 2 měsících při přetrvávající duodenální píštěli. Pacientka byla již připravována k operační revizi, ale náhle zemřela pod obrazem akutním infarktu myokardu. Ostatní operovaní byli sledováni až do úmrtí, doba sledování byla od 2 do 31 měsíců. Jedna pacientka byla operována s použitím HIPEC 2x. Tato nemocná je popsána v následující kasuistice.

4.2.1 Kasuistika – potenciál HIPEC v léčbě pokročilého karcinomu žaludku

35 letá nemocná byla vyšetřována pro adnex tumor obou ovarii. V anamnéze rok před přijetím žaludeční obtíže s provedením gastrokopického vyšetření, kdy nebyla nalezena žádná patologie. Nyní indikována ke gynekologické revizi. Předoperační CT nález zaměřený na malou pánev bez patologie v oblasti epigastria (Obr. 18)

Obr. 18

Předoperační CT nález – tumor v oblasti adnex (prim. MUDr. Kašpar, RDG klinika FNB)

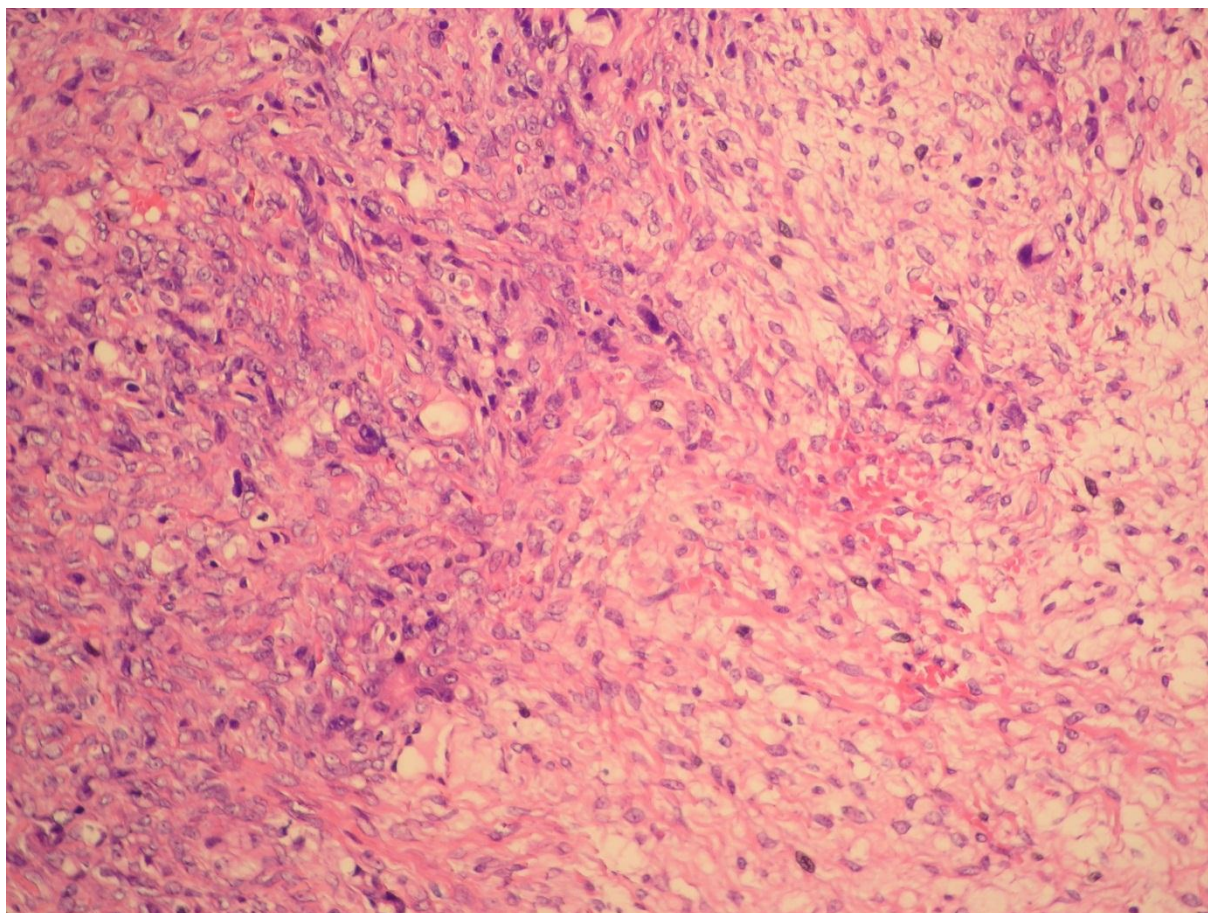


Při operaci provedena hysterektomie a bilaterální adnexektomie. Peroperační histologické vyšetření ukazuje tumor z prstenčitých buněk s největší pravděpodobností metastáza z GIT (žaludku). Součástí výkonu byla i apendektomie, v preparátu byla rovněž nalezena metastáza karcinomu. Nález peroperačně konzultován s chirurgem a bylo rozhodnuto o dovyšetření

nemocné a v případě potvrzení diagnózy karcinomu žaludku pokus o paliativní resekční výkon doplněný HIPEC.

Obr. 19

Metastáza karcinomu žaludku v ovariu (prim. MUDr. Vítková, Ústav patologie FNB)



V pooperačním období, po prvotním gynekologickém výkonu, byla provedena gastrokopie potvrzující karcinom žaludku a nemocná byla indikována k operaci. Hladina onkomarkerů v krvi před výkonem byla CEA 0,9 ug/l, Ca 19-9 1,1 U/ml. Operace proběhla měsíc po gynekologickém výkonu.

Operační nález a výkon:

Játra bez metastáz, peritoneum bez makroskopických známek karcinózy, tumor zabírá celé tělo žaludku s maximem při malé křivině, antrum a distální jícen jsou volné. Provedena laváž epigastria s odběrem tekutiny na cytologické a biochemické vyšetření. Tumor adhezuje k mesotransversu, odkud se ho daří uvolnit. Provedena gastrektomie s uzavřením duodena a distálního jícnu lineárním staplerem, D2 lymfadenektomie s peroperačním vyšetřením uzliny v hilu sleziny, která byla negativní, proto nebyla indikována splenektomie. Dále excize tukové tkáně mezotransversa, kde naléhal tumor a části jizvy po gynekologické operaci (ke které adherovaly kličky tenkého střeva). Následovala 90-ti minutová hypertermická laváž dutiny břišní roztokem 90 mg doxorubicinu. Rekonstrukce byla provedena mechanickou termino – laterální esofago-jejuno anastomózou na Roux Y kličku (po zkrácení jícnu o cca 5 mm s řadou svorek). Současně zkrácen pahýl duodena a uzavřen znovu staplerem. V pooperačním průběhu byla dutina břišní lavážována 5 fluorouracylem v dávce 1000 mg po dobu pěti dnů. V pooperačním průběhu se 10. pooperační den objevily teploty a byla diagnostikována kolekce v levém subfreniu, která

byla vyřešena CT navigovanou drenáží. Propuštěna byla 21. pooperační den.

Histologické, cytologické a biochemické vyšetření:

Žaludek - difúzní karcinom žaludku prorůstající celou stěnou do přilehlého tuku. Jednotlivé nádorové buňky zachyceny imunohistochemickým vyšetřením v tuku omenta. Celkem vyšetřeno 21 lymfatických uzlin, v 9 zastižena metastáza karcinomu.

Kroužky anastomózy bez nádorových buněk, stejně jako část pahýlu duodena, která byla reresekována po hypertermické laváži. V části distálního jícnu, který byl odstraněn po laváži, zachycena dilatovaná lymfatika s nádorovými buňkami.

Část mezotransversa a jizva po gynekologické operaci rovněž s metastatickým postižením. Imunochemické vyšetření cytokeratin AE1/3 pozitivní.

Cytologické vyšetření - aktivace mezotelu bez atypií

Biochemické vyšetření - CEA 0,8 ug/l Ca 19-9 2,2 U/ml.

TNM klasifikace pT3N2M1, stadium IV

Další průběh:

V pooperačním období pacientka absolvovala paliativní chemoterapii a byla dispenzarizována ve 3 měsíčních intervalech s klinickým, biochemickým, CT/CT-PET a endoskopickým vyšetřením. Nemocná byla bez klinických obtíží, sérové hladiny onkomarkerů byly po celou dobu sledování v normě, fibroskopické vyšetření bez nálezu patologie včetně biopsií z anastomózy. Na PET CT rok po výkonu vysloveno podezření na lokoregionální recidivu tumoru. Proto po dohodě s pacientkou a onkology byl indikován pokus o second look operaci, event. s pokusem o odstranění recidivujícího tumoru a novou hypertermickou laváž.

Second look operace:

Po obtížném průniku do dutiny břišní pro četné srůsty zjištěno difúzní postižení peritonea jak parietálního, tak viscerálního s četnými uzly do 3mm a několika většími nádorovými implantáty jak v epigastriu, tak v podbřiších (až do 3 cm). Jednalo se o stupeň 4 postižení peritonea dle Gillyho klasifikace. V dutině břišní nebyl ascites. Za této situace byla provedena pouze paliativní hypertermická cytostatická laváž 90 mg doxorubicinu. Před laváží ještě proplach pánve a odběr na cytologické a biochemické vyšetření.

Histologie z uzlíků potvrzuje šíření difúzního karcinomu žaludku imunohistochemicky AE1/3 pozitivního. Cytologické vyšetření bez atypií, biochemické vyšetření z laváže CEA 157,9 ug/l a Ca 19-9 7688 U/l.

Obr. 20
CT nález s výraznou peritoneální karcinomatózou
(prim. MUDr. Kašpar, RDG klinika FNB)



Další průběh:

Vzhledem k peroperačnímu nálezu indikoval onkolog pokračování v paliativní chemoterapii. Dispenzarizace probíhala pouze za klinických kontrol. Nemocná přežila druhý operační výkon 18 měsíců, po celou dobu sledování se u ní nevytvořil ascites ani se neobjevila porucha pasáže. V posledních měsících se projevovала anemie, pravděpodobně z okultních ztrát do GIT případně i z poruchy krvetvorby.

Sekční nález:

Mnohočetné metastázy karcinomu v lymfatických uzlinách včetně inguinálních, játrech, pankreatu, karcinóza peritonea.

Pacientka s generalizovaným difúzním karcinomem žaludku tedy přežila 32 měsíců od stanovení diagnózy při kombinaci chirurgické léčby doplněné HIPEC a léčby onkologické. Přežití bylo relativně dlouhé bez obvyklých komplikací provázejících tento typ nádoru s postižením peritonea (ileózních stavů z obstrukce, ascitu atd.).

4.3 Karcinom pankreatu

Pacientů s diagnózou primárního nádoru pankreatu jsme do naší sestavy zahrnuli celkem 81. V 75 případech šlo o klasický duktální adenokarcinom, 6x byl histologicky zjištěn neuroendokrinní tumor. Jak ukazuje následující tabulka 23 cytologické vyšetření prokázalo, relativně větší počet nálezů hodnocených ve stadiu II. A III., ale na rozdíl od karcinomů žaludku bylo relativně málo nálezů IV. stadia. Z biochemických nálezů se ukázalo jako typické, že u neuroendokrinních nádorů nebyla nikdy zjištěna pozitivita onkomarkerů. Na

rozdíl od nálezů na žaludku, kde předchází rozsev po peritoneu, u karcinomu pankreatu se nejprve objevují metastázy jaterní (graf 20).

Tab. 24
Výsledky cytologického vyšetření

Stadium	Cytologické vyšetření			
	benigní	suspektní	maligní	Celkem
Ia	1			1
Ib	5			5
IIa	3	1		4
IIb	13	5		18
III	14	2		16
IV	25	6		31
Neuroendokrinní	5	1		6
Celkem	66	15	0	81

Cytologie: Opět byla zachycena suspektní cytologie ve stadiích II a III. V pokročilém stadiu choroby, ve stadiu IV, nebylo procento pozitivních cytologických nálezů ani zdaleka tak vysoké jako u karcinomu žaludku. Jasně pozitivní cytologický nález jsme nezachytili. (Tab. 24)

Tab. 25
Výsledky biochemického vyšetření

Stadium	Biochemické vyšetření			
	CEA norma	CEA elevace	Ca 19-9 norma	Ca 19-9 elevace
Ia				
Ib	3		3	
IIa	3		3	
IIb	12		9	3
III	7		4	3
IV	14	8	9	12
Neuroendokrinní	6		6	
Celkem	45	8	34	18

Biochemie: Elevaci Ca19 – 9 jsme zaznamenali ve stadiu IIb, III i IV. Elevaci CEA jsme zjistili pouze ve stadiu IV. U neuroendokrinních tumorů jsme nikdy nezaznamenali elevaci onkomarkerů. (Tab. 25) Vyšetřeno bylo méně pacientů než u cytologického vyšetření, což bylo částečně způsobeno pozdějším zařazením biochemie do sledování a částečně administrativně (omezení hrazení vyšetření ZP na 1x týdně).

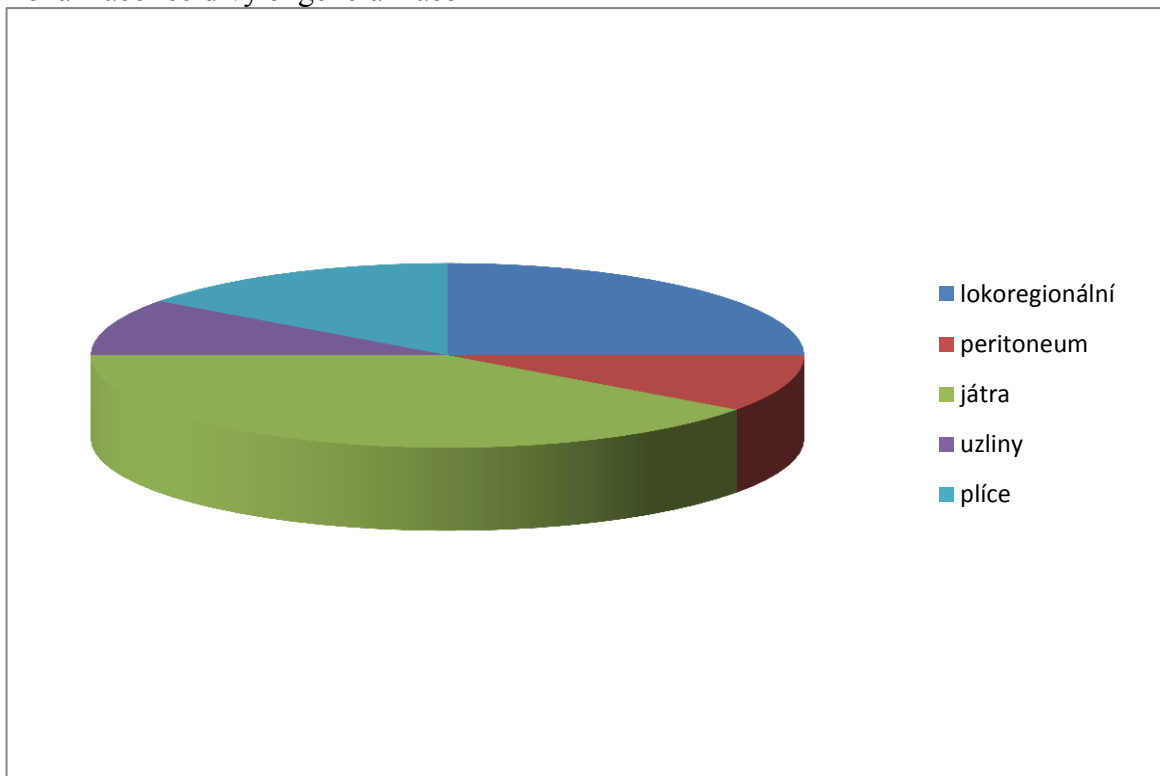
Tab. 26
Srovnání cytologického a biochemického vyšetření

	Biochemie pozitivní	Biochemie negativní
Cytologie pozitivní	6	4
Cytologie negativní	15	26

Výsledky jsou podobné jako u karcinomu žaludku. Domníváme se, že je to dáno spíše citlivostí metody, než typem zhoubného nádoru.

Graf 20

Lokalizace recidivy či generalizace

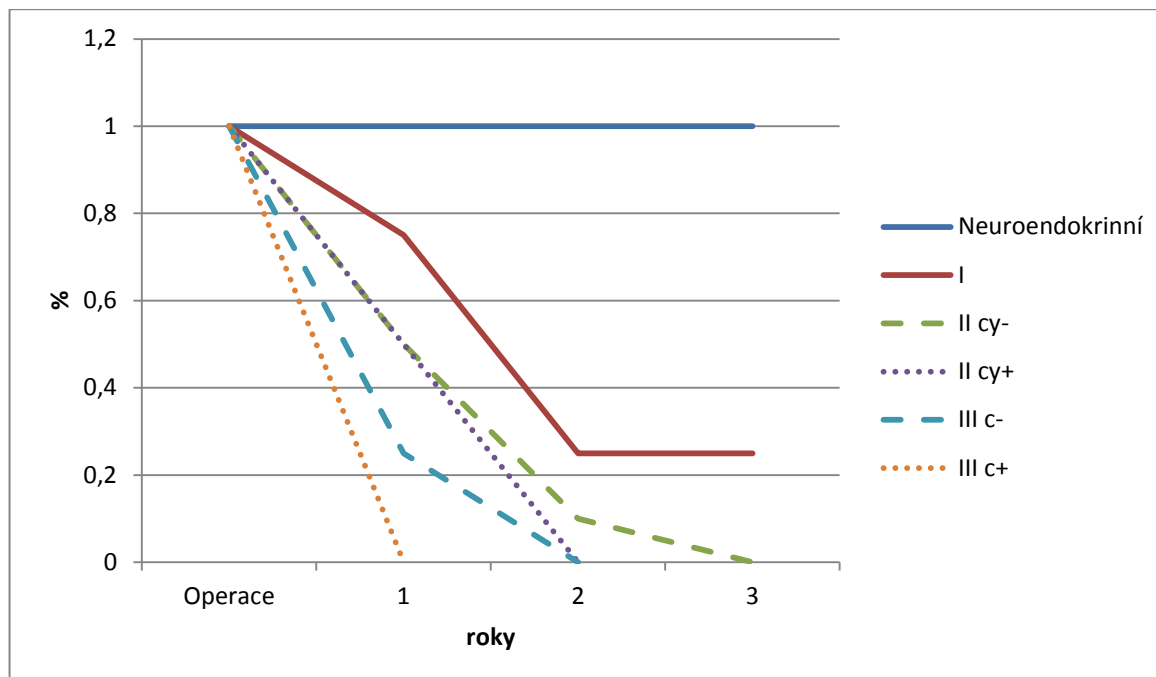


Jednoznačně převažují lokální recidivy a generalizace do jater. (Graf 20) U pěti nemocných se recidiva či generalizace objevila ve více místech (vždy šlo o kombinaci metastáz v játrech s další lokalizací).

4.3.1 Vliv cytologického a biochemického vyšetření na prognózu

Graf 21

Závislost prognózy délky přežití nemocných na výsledku cytologického vyšetření



Z grafu 21 je patrná obecně špatná prognóza nemocných s karcinomem pankreatu, delší přežití jsme zaznamenali jen u časného stadia I, v kterém jsme nikdy neměli pozitivní cytologický nález. Ve vyšších stadiích byla prognóza víceméně stejná, jistě také ovlivněná malým počtem nemocných v jednotlivých skupinách. Vzhledem k malému počtu nemocných v jednotlivých skupinách jsme provedli srovnání skupiny s pozitivní peritoneální cytologií proti pacientům negativním. Rozdíl nebyl statisticky významný ($p = 0,9$). Stejně jako u karcinomu žaludku ale i v tomto malém souboru byla patrně lepší přežívání nemocných s negativním cytologickým vyšetřením proti pacientům ve stadiu IV (st I + II vs. IV $p = 0,0013$, st I – III vs IV $p = 0,0022$). Tento rozdíl není patrný u nemocných cytologicky pozitivních ($p = 0,012$)

4.3.2 Výsledky pooperačních odběrů

Tab. 27

Výsledky pooperačních cytologických odběrů

Stadium	Cytologické vyšetření			
	Benigní	suspektní	maligní	celkem
I	1	0		1
II	2	1		3
III	2	0		2
Celkem	5	1	0	6

Tab. 28

Výsledky pooperačních biochemických odběrů

Stadium	Biochemické vyšetření			
	CEA norma	CEA elevace	Ca 19-9 norma	Ca 19-9 elevace
I	1		1	
II	3		2	1
III	1	1	1	1
Celkem	5	1	4	2

Cytologie a Biochemie: Pooperačních odběrů u karcinomu pankreatu bylo provedeno málo proto, že recidiva onemocnění byla již patrná na zobrazovacích vyšetřeních v době plánovaného odběru. U pacientů kde k vyšetření došlo, bylo pozitivních nálezů málo a nijak nepřispěly k časně diagnostice. (Tab 27, 28)

4.4 Nádory žlučového stromu

Bylo vyšetřeno celkem 12 nemocných. Při cytologickém vyšetření jsme nález hodnotili jako suspektní 2x. Při biochemickém vyšetření bylo naopak zjištěno, že relativně vysoký je pozitivní nález při karcinomu žlučníku u markeru Ca 19-9, kde jsme zaznamenali zvýšení u více než 50 % probandů.

Tab. 29

Výsledky cytologického vyšetření

Stadium	Cytologické vyšetření			
	benigní	suspektní	Maligní	celkem
Iib	4			4
III	2			2
IV	5	2		7
Neurčeno	3			3
Celkem	14	2		16

Cytologie : Pozitivní cytologické vyšetření bylo zachyceno pouze 2x a to ve stadiu IV. Bohužel z technických důvodů nebylo provedeno toto vyšetření u všech nemocných. (Tab 29)

Tab. 30
Výsledky biochemického vyšetření

Stadium	Biochemické vyšetření			
	CEA norma	CEA elevace	Ca 19-9 norma	Ca 19-9 elevace
I Ib	4		1	3
III		1	2	
IV	6	2	3	4
Neurčeno	3		2	2
Celkem	13	3	8	9

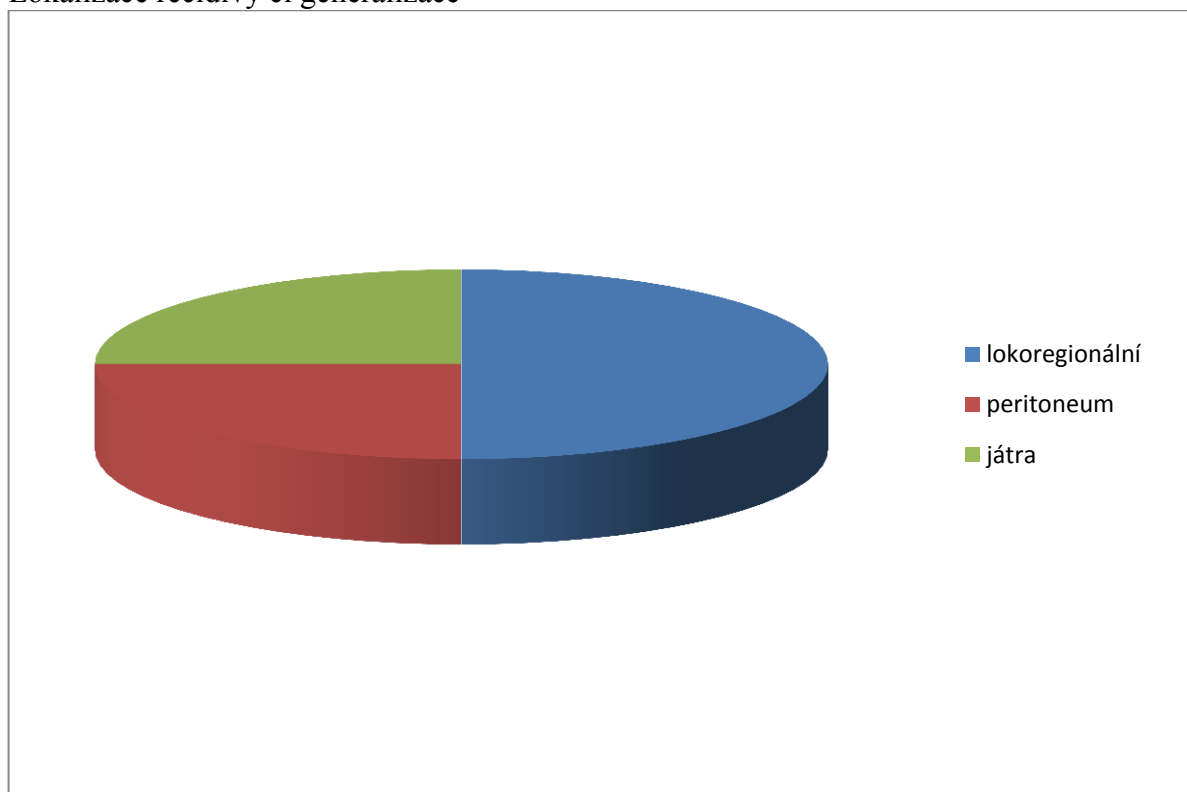
Biochemie: Překvapivý je relativně vysoký záchyt positivity Ca19-9 u karcinomu žlučníku (více než 50 % případů). Ale vzhledem k malému počtu pacientů lze obtížně z tohoto faktu vyvozovat závěry. (Tab 30)

Tab. 31 Srovnání cytologického a biochemického vyšetření

	Biochemie pozitivní	Biochemie negativní
Cytologie pozitivní	2	
Cytologie negativní	9	4

Graf 22

Lokalizace recidivy či generalizace



I přes malý počet nemocných lze soudit, že lokální recidivy představují většinu terapeutických selhání (v našem malém souboru 50%) (Graf 22)

4.4.1 Vliv cytologického a biochemického vyšetření na prognózu

Zjednodušeně lze konstatovat, že u pacientů s pozitivním biochemickým vyšetřením se objevila lokoregionální či intraperitoneální recidiva, pacienti s negativním vyšetřením laváže měli spíše tendenci ke generalizaci do jater.

Extrémním případem je pacientka stadia IIb (T2N1M0), u které byl nález v lavážní tekutině cytologicky negativní ale s elevací Ca 19-9 na 170,9 U/ml. U této pacientky se objevila do 9 měsíců rozsáhlá intraperitoneální recidiva s ascitem a metastázami na ovariích typu Krukenbergerova nádoru.

4.5 Gastrointestinální stromální nádory

GIST je relativně novou skupinou onemocnění, u kterých dosud nebyl zjištěn žádný biochemický marker, proto jsme jej ani nemohli sledovat. Soustředili jsme se u těchto mesenchymálních nádorů na určování cytologie. Zaznamenali jsme pozitivní nálezy ve skupině středního a vysokého rizika. (Tab. 32)

Tab. 32

Výsledky cytologického vyšetření

Riziko dle Fletchera	Cytologické vyšetření			
	benigní	suspektní	maligní	celkem
Nízké	8			8
Střední	1	2		3
Vysoké	3	2		5
Celkem	12	4		16

Vliv výsledku cytologického vyšetření na prognózu

Ve sledované skupině se objevil pouze 1 případ rekurence onemocnění, šlo o nemocného ve vysokém riziku, s pozitivní peritoneální cytologií, kde se po 2 letech objevil rozsev nádoru po dutině břišní.

4.6 Vyšetření RT – PCR

Po vyhodnocení prvních výsledků cytologického vyšetření, kdy především senzitivita vyšetření byla neuspokojivá, rozhodli jsme se zařadit biochemické vyšetření laváže dutiny břišní s cílem zvýšení senzitivity. Výsledky však opět nebyly dostatečně uspokojivé. Sice došlo ke zvýšení citlivosti metody (senzitivita stoupla z 34 % na 53 %), ale ani tyto výsledky jsme nepovažovali za dostatečné pro klinickou aplikaci. Proto byly hledány další cesty, jak zlepšit citlivost vyšetření lavážní tekutiny z dutiny břišní. Po konzultaci s patologií jsme zamítli možnost imunohistochemického vyšetření a posléze jsme se soustředili na vyšetření RT – PCR (Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction).

Ve srovnání s použitím cytologického stanovení je kvantitativní RT - PCR senzitivní technika umožňující detekci karcinomových buněk na základě stanovení exprese CEA mRNA. Pro potencionální využití této metody v klinické praxi je nezbytné ji optimalizovat tak, aby byly eliminovány jak falešně pozitivní, tak falešně negativní výsledky. Aby mohlo

být dosaženo pozitivního výsledku, musí být z výchozího materiálu získána kvalitní nedegradovaná RNA.

Pro izolaci RNA z buněk získaných z peritoneálních laváží jsme postupně testovali izolační sety od firem Promega, Eppendorf a Qiagen. Všechny zmíněné sety byly v laboratoři úspěšně používány k izolacím RNA v rámci jiných výzkumných projektů. Přesto se nám při jejich aplikaci nepodařilo získat dostatečně kvalitní materiál, umožňující provedení RT-PCR. Celkem bylo vyšetřeno 50 vzorků peritoneálních laváží. Získaná RNA byla při použití setů Promega a Eppendorf do značné míry degradovaná. Po konzultaci s odborníky s firmy Qiagen, a na základě jejich doporučení, jsme použili kombinaci produktů RNA Protect Cell Reagent a izolačního kitu RNeasy Mini plus. Uvedeným způsobem jsme získali kvalitnější RNA, ale jak se následně ukázalo, její kvalita a také kvantita stále nebyla dostatečná k provedení RT-PCR tak, abychom mohli vyloučit falešně negativní nebo pozitivní výsledky.

Příčinu vidíme ve složení vstupního roztoku z peritoneální laváže, který kromě živých buněk obsahuje také příměs erytrocytů, produktů rozpadajících se buněk včetně uvolněných enzymů, které degradují RNA. Další problém představuje malé množství získaného materiálu, který je daný zachováním poměru mezi odebranou tekutinou a RNA lyterem. Také manipulace vzorkem bezprostředně po odběru představuje rizikovou fázi, kdy vzorky musí být co nejrychleji zpracovány a uloženy při teplotě -8°C až -80°C (podrobnosti jsou popsány na str. 36).

Možným řešením tohoto problému by bylo zkrácení cesty vzorku od pacienta k definitivnímu zpracování umístěním všech nutných technických zařízení do prostorů zázemí operačních sálů, což v našich podmínkách nebylo možné ani prostorově, ani finančně.

5 Výsledky – souhrn

Na základě našeho poměrně rozsáhlého materiálu 220 operovaných nemocných s pokročilými zhoubnými nádory v dutině břišní, kteří se podrobili našemu výzkumu sledování cytologických a biochemických ukazatelů z tekutiny dutiny břišní, můžeme uvést následující:

- senzitivita i specificita cytologického vyšetření je v našich podmínkách nižší než v asijských studiích
- pozitivní cytologické i biochemické nálezy byly zachyceny u stadií I a II karcinomu žaludku i pankreatu – může signalizovat generalizaci onemocnění nezachytitelnou jinými metodami
- pacienti s pozitivním cytologickým i biochemickým nálezem měli větší tendenci k vzniku intraperitoneální a lokoregionální recidivy, hodnoty ale nejsou statisticky signifikantní
- neprokázali jsme statisticky významnou souvislost mezi cytologickým a biochemickým nálezem v dutině břišní a prognózou nemocných podle jednotlivých stadií AJCC (kromě karcinomu žaludku stadia I). Zde je nutné zohlednit, že jde o heterogenní soubory nemocných a při subklasifikaci podle stadií a typu tumoru může docházet k chybě malých čísel. Prokázali jsme ale výrazně horší přežívání nemocných s pozitivní peritoneální cytologií, které koreluje s prognózou nemocných ve stadiu IV (jak u karcinomu žaludku, tak u karcinomu pankreatu)
- aplikace HIPEC u pacientů s karcinomem žaludku a peritoneální diseminací zabránila tvorbě maligního ascitu (platí i pro jiné nádory než sledované v této práci – prioritní pozorování týmu prof. Antoše)
- pozitivní cytologický nález ve IV stadiu karcinomu žaludku byl vždy spojen s technickou neresekabilitou – dosud nepublikováno ve světovém písemnictví
- nepodařilo se nalézt vhodnou techniku zpracování peritoneální laváže k izolaci a detekci CEA RNA cestou RT PCR
- pooperační cytologické a biochemické vyšetření laváže získané punkcí v odstupu 6 – 12 měsíců od operace se neukázalo přínosné pro diagnostiku případné intraperitoneální recidivy

6 Diskuse

Podle literárních údajů (2, 7, 8, 24, 27, 37, 42, 43, 52, 56) u tumorů žaludku, slinivky břišní, žlučového stromu způsobuje intraabdominální recidiva onemocnění téměř polovinu případů selhání léčby.

Většina prací, která se věnuje vlivu nádorových buněk na prognózu onemocnění, se týká karcinomu žaludku. Jsou to studie ze zemí východní Asie, především Japonska. Evropských a amerických studií je méně (2, 7, 8, 11, 18, 33, 37, 43).

Některé východoasijské studie uvádějí, že peritoneální cytologie má 90 – 95 % senzitivitu a téměř 100 % specifitu (2, 7, 18, 34, 37). Jiné studie z Japonska udávají senzitivitu 34 – 60 %. Námi dosažené výsledky však prokazují, že senzitivita nálezů cytologických i biochemických je podstatně nižší, výsledky se pohybují na dolní hranici japonských studií. Obdobné senzitivity a specifity jako náš tým, ale dosahují i jiní autoři z Evropy a USA (11, 17, 33, 40, 43).

Příčinou těchto rozdílů může být odlišné hodnocení určitých znaků asijskými a euroamerickými patology. Jde o obdobnou situaci, jako hodnocení early gastric cancer a high grade dysplasia, kdy asijsí patologové se častěji přiklání k diagnóze karcinomu, zatímco evropští a američtí k diagnóze dysplasie (27, 28, 52). Další příčinou nižší senzitivity cytologického vyšetření může být to, že jde o vysoce expertdependentní vyšetření, kdy autoři ze zemí, kde jsou tato vyšetření zavedena rutinně, mají s rozdíly mezi benigním a maligním cytologickým nálezem výrazně vyšší zkušenosti. V Evropě a USA jde spíše o hodnocení v rámci různých studií, než o rutinní klinickou praxi.

Jeden z důvodů rozdílných výsledků může být také způsob odběru lavážní tekutiny. Množství zaváděné tekutiny se různí podle autorů. Od 50 ml (8, 37, 55), přes 100 - 200 ml fyziologického roztoku (32, 39, 40, 51, 56, 64) až po množství podstatně větší od 300 do 2000 ml (35, 43).

Rovněž místo aplikace tekutiny se liší. Nejčastěji je aplikována do Douglasova prostoru (20, 30, 37) a do subhepatických prostorů (8, 40, 55, 64). Zřídka je tekutiny aplikována na jiná místa např. inframezokolicky nebo do omentální bursy cestou foramen Winslowi (51).

Odběr materiálu z Douglasova prostoru logicky vychází z fyziologie proudění tekutiny v peritoneální dutině.

Všechny práce se shodují v časování laváže – bezprostředně po otevření dutiny břišní nebo zavedení portů při laparoskopii, ještě před manipulací s orgány a tumorem. Jde o upřesnění stagingu či prognózy onemocnění. Pouze výjimečně je sledován výskyt volných nádorových buněk v průběhu operace nebo po jejím skončení (39, 57). Teoreticky i takto „iatrogeně“ uvolněné nádorové buňky mohou mít vliv na budoucí rekurenci onemocnění

Výskyt volných nádorových buněk v peritoneální dutině však není závislý ani na lymfatické invazi ani na přítomnosti metastatických ložisek v játrech. Předpokládá se, že když tumor dosáhne subserózní vrstvy, mohou se nádorové buňky uvolňovat do peritoneální dutiny. Pozitivita peritoneální cytologie u nádorů T1 – 2 se pohybuje mezi 0 – 13% (6, 11, 21, 27). Z toho vyplývá, že nález volných nádorových buněk v dutině břišní může predikovat lokoregionální či peritoneální recidivu. **Proto nelze v těchto případech předpokládat konvenční chirurgický přístup za R0 resekci.**

6.1 Žaludek

Pozitivní cytologické vyšetření laváže dutiny břišní je v japonské klasifikaci (a nově i v AJCC verze 7) hodnocena jako onemocnění stadia IV – generalizace. Procento pozitivních cytologických nálezů celkem pochopitelně stoupá s velikostí tumoru, postižením uzlin,

lymfatickou a cévní invazí tumoru a event. s postižením serózy nebo s nálezem vzdálených metastáz.

Existuje řada studií, které korelují výskyt volných nádorových buněk s TNM klasifikací (11, 37, 46, 47). Je důležité ukázat, že pozitivní cytologické nálezy jsou nacházeny u tumorů T2 (až v 13 %), ale už u tumorů T1, kde byl záchyt pozitivní peritoneální cytologie až v 9 %. Stejná korelace je popisována i u biochemického vyšetření (37, 46). U pokročilých tumorů T3 a T4 je záchyt pozitivní peritoneální cytologie 14 – 44 % resp. 42 – 64 % (11, 37, 46, 47). Stejný nárůst pozitivní peritoneální cytologie a biochemie je popisován se vzestupem N stadia. Pozitivní peritoneální cytologie je až u 17 % nemocných (46) klasifikovaných N0, zatímco u pacientů klasifikovaných N3 je tato pozitivita v 28 – 48 % (11, 46, 47). Při výskytu vzdálených metastáz jsou nálezy v peritoneální tekutině pozitivní až v 55 % (11).

S těmito závěry ne zcela korelují naše výsledky. Suspektní peritoneální cytologii jsme zaznamenali v 8 % ve skupině T1 a T2 tumorů. Toto souvisí pravděpodobně s obecně nižší senzitivitou těchto vyšetření v našich podmínkách. U vzdálených metastáz jsme zachytili pozitivní peritoneální cytologii ve 40 %, což je srovnatelné s výše uvedenými studiemi. Naproti tomu záchyt elevace onkomarkerů v lavážní tekutině v této skupině byl vyšší, blížil se 65 %. To souvisí pravděpodobně se složením souborů, kdy v našem byl vyšší počet pacientů s peritoneálními metastázami než metastázami do jater. Nicméně stejně jako ostatní autoři jsme zaznamenali výrazné horšení prognózy nemocných s pozitivními nálezy v peritoneální dutině a i v našich podmínkách je prognóza srovnatelná s pacienty se vzdálenými metastázami.

Obdobné výsledky mají studie, které sledují výskyt pozitivní cytologie a biochemie v závislosti na stadiu onemocnění (37, 46, 47, 55). Pozitivní peritoneální nálezy stoupají od 0 – 12 % ve stadiu I až po 32 – 60 % ve stadiu IV, opět s negativním prognostickým korelátem stran přežití. V naší studii se pozitivní cytologický nález pohyboval mezi 17 – 20 % ve stadiu I – III s výrazným vzestupem ve stadiu IV, kde bylo procento pozitivních záchytů navýšeno téměř 40 %.

Přestože procento záchytu volných nádorových buněk v závislosti na pokročilosti onemocnění se pohybuje v širokém rozmezí, všechny výše uvedené práce se shodují na výrazně horší prognóze pacientů s pozitivním cytologickým nálezem. Tento rozdíl výrazně je statisticky významný ($p < 0,001 - 0,0001$) (11, 25, 37, 47). Tento rozdíl jsme pozorovali i v naší studii.

Žádný z pacientů ve stadiu III a pozitivní cytologií nepřežil 1000 dnů a žádný s pacientů ve stadiu IV a pozitivní cytologií nepřežil 500 dnů (55).

Ke stejným údajům dospěl i R. Rosenberg (47), který srovnával přežití pacientů na základě T a N stadia a výsledků peritoneální cytologie. Podle této studie neměl nález volných nádorových buněk vliv na přežití pouze u stadia IA. Autor užíval imunocytochemické vyšetření.

Stejně jako jsou rozdíly v délce přežití mezi pacienty s pozitivním a negativním nálezem volných nádorových buněk, je i rozdíl, kde je recidiva lokalizována. Pozitivní peritoneální cytologie je považována za nezávislý faktor vzniku intraperitoneální diseminace. Senzitivita 56 % a specifita 97 % (6).

S těmito výsledky korelují i naše nálezy, kdy jsme prokázali výrazně horší přežívání nemocných s karcinomem žaludku a pozitivní peritoneální cytologií, bez ohledu na stadium. Tím prokazujeme oprávněnost změny klasifikace z verze 6 na verzi 7 a použitelnost cytologického vyšetření i v našich podmínkách. Zároveň se potvrdila tendence k vzniku intraperitoneální recidivy v případě pozitivního cytologického a biochemického vyšetření.

Elevace onkomarkerů v séru naproti tomu lehce zvyšovala procento jaterních metastáz. Tento rozdíl nebyl statisticky významný.

Hladina onkomarkerů v peritoneální dutině dává méně jednoznačné výsledky. Podle Ji-Kun Li (34) je peritoneální hladina CEA senzitivnějším faktorem vzniku peritoneálních metastáz než cytologie, která je považována za zlatý standard. Senzitivita 94,9 % proti 73,7 % u cytologie, specificita 82,2 % (CEA) vs. 97,8 % (cytologie). Naproti tomu R. J. Bold (7) neprokázal vliv peritoneální hladiny CEA na pozdější nález peritoneální recidivy. Tento typ recidivy však v této studii predikuje intraperitoneální hladina CA-125 (cut-off hodnota 35 IU/ml).

Naše studie ve shodě s literaturou prokazuje nepříznivý vliv pozitivního (i suspektního) cytologického i biochemického nálezu. Bohužel se nám nepodařilo dosáhnout odpovídající senzitivity jako u japonských prací.

6.2 Pankreas

Cytologické vyšetření laváže dutiny břišní zařazují některá centra do diagnostického algoritmu i u karcinomu pankreatu (22, 29, 53, 61, 64). Laváž je odebírána v průběhu diagnostické laparoskopie. Pozitivní cytologie je indikátorem neresekabilního, agresivního onemocnění s rychlým vznikem metastáz a krátkou dobou přežití (29, 33). Proto také 6. vydání Cancer staging manual AJCC pozitivní peritoneální cytologii klasifikuje jako výskyt vzdálených metastáz (53). Předpokládá se, že pozitivní cytologie je projevem ventrálního šíření tumoru a signalizuje průnik nádorových buněk přes peritoneum omentální bursy (22). U 12 – 30 % nemocných je pozitivní peritoneální cytologie jediným projevem generalizace onemocnění (29, 35, 55, 64). Nález volných nádorových buněk je častější u větších tumorů (nad 4 cm), u tumorů těla a ocasu 20 % : 55 % (29, 61, 64). Častěji je také zachycen u nemocných, kteří podstoupili tenko-jehlovou biopsii k ověření biologické povahy patologického procesu 17 : 28 % (29).

I my jsme pozorovali zhoršení prognózy pacientů s karcinomem pankreatu při pozitivním cytologickém a biochemickém nálezu. Procento pozitivních záchytů stoupalo s velikostí a pokročilostí tumoru. Z biochemických parametrů byl v našich podmínkách citlivější marker Ca 19-9 než CEA. Kazuisticky jsme zaznamenali výše popsáný agresivní typ onemocnění u pacienta s pozitivním cytologickým nálezem a rychlou intraabdominální generalizací tumoru se vznikem ascitu a nádorových hmot na ováriích charakteru Krukenbergerova tumoru.

6.3 HIPEC

V případě peritoneálního rozsevu používají některá centra kombinovaný onkochirurgický výkon, který spočívá v doplnění operace intraoperační aplikací cytostatika v roztoku o teplotě 42 – 43 stupně Celsia (5, 9, 12, 16, 17, 18, 19, 54, 58, 70, 74). Tato laváž obvykle trvá 90 minut. V závislosti na diagnóze a rozsahu intraabdominálního výkonu může ještě navazat další aplikace cytostatika po dobu 5 dnů. Již bez použití hypertermie (16, 17, 18, 54)

Nejčastěji se používají tato cytostatika (5, 9, 54, 58, 70): Mitomycin C, Doxorubicin a cisplatina či karboxyplatina. Typ použitého cytostatika závisí na primárním nádoru a klinickém stavu nemocného. Ve shodě s údaji v literatuře (12, 54) jsou naše současné indikace k použití HIPEC neinvazní peritoneální karcinomatóza či sarkomatóza (*pseudomyxom*), peritoneální mesoteliom, peritoneální rozsev invazního karcinomu,

perforované karcinomy GIT, karcinomy přiléhající a infiltruující okolní orgány, karcinomy GIT s pozitivní peritoneální cytologií, peroperačně prasklé tumory, recidivy ovariálních karcinomů, paliativní léčba jinak neovlivnitelného maligního ascitu.

Asi nejúspěšnější jsme byli při použití HIPEC v léčbě pseudomyxomu peritonea, který často souvisí s mucinózním adenomem apendixu. Neléčený pseudomyxom vede neodvratně k smrti pacienta (5, 9, 54). Další diagnózou, kde se nám HIPEC osvědčil je peritoneální mesoteliom (asi 1/5 – 1/3 všech), většinou spojených s ascitem (5, 9, 17, 54). Samotná onkologická léčba mesoteliomu není úspěšná. Zatímco autoři používající k léčbě mesoteliomu klasické onkologické prostředky – jako Chailleux, Antman ad (5, 9, 54) dosahují průměrného přežití 9 – 15 měsíců, publikace autorů, kteří kombinují cytoreduktivní výkon s HIPEC (Sugerbaker, Deraco, Glehen et al. 12, 17, 54), dosahují 2 letého přežití 58 – 77 %, 5ti letého 29 – 59 a Sugerbaker a Loggie (54) popisují dokonce 7 leté přežití v 33 – 39 %.

I v případě pokročilých intraabdominálních nádorů s postižením peritonea karcinózou, kde současná medicína nemá účinnou léčebnou modalitu a přežití nemocných se počítá v měsících (5, 9, 49), dává kombinace agresivní cytoredukce a intraoperační chemoterapie nadějně výsledky. Největší zkušenosti jsou u pacientů s karcinózou peritonea s primárním nádorem v oblasti apendixu, případně s pseudomyxomem peritonea. U těchto nemocných je popisováno 3leté přežití 83 % a 10ti leté 65 %. 3leté přežití přes 40 % je uváděno u kolorektálního karcinomu a intraabdominálního sarkomu (18, 54).

Pochopitelně takto extenzivní výkony spojené s aplikací hypertermické chemoterapie jsou provázeny vyšším počtem chirurgických i nechirurgických komplikací. Procento komplikací zvyšuje i fakt, že pacienti trpí pokročilou formou maligního onemocnění, která ovlivňuje jejich celkový stav. Na druhou stranu si je nutné uvědomit, že pro tuto skupinu nemocných neexistuje žádná jiná terapeutická alternativa.

Nejčastější komplikací, která je prakticky považována za normu, je prolongovaný pooperační ileus, který se vyskytuje téměř u všech pacientů s HIPEC. Jde o prodloužení pooperační paralýzy GIT v důsledku hypertermie. Ze závažných chirurgických komplikací jsou popisovány insuficience anastomóz, píštěle GIT a biliárního traktu a krvácení vyžadující reoperaci. Frekvence těchto komplikací je mezi 6 – 9 %. Z nechirurgických komplikací jsou nejčastější plicní komplikace (26 %). Velmi závažné a specifické pro tento typ léčby jsou hematologické poruchy. Hematologická toxicita III a IV stupně se vyskytuje u téměř 5 % nemocných po HIPEC (54, 74).

Kromě operací žaludku, které jsou uvedeny výše, byl na Chirurgické klinice 1. LF UK FN Na Bulovce aplikován HIPEC na pseudomyxom peritonea (19 %), peritoneální mesoteliom (13 %), gynekologické karcinomy (30 %), kolorektální karcinom (23 %) a ostatní karcinomy nitrobřišní (11 %). Karcinomy žaludku představují 4 % souboru. Morbidita celého souboru byla 25 % a letalita 4,4 %, což odpovídá světovým zkušenostem. Navíc se v celém souboru projevil vliv získaných zkušeností, takže morbidita i letalita klesala s počtem operovaných nemocných. Ve shodě se světovým písemnictvím byly nejlepší výsledky zaznamenány u pseudomyxomu peritonea a mesoteliomu, kde bylo 3 leté přežití 80 % resp. 60 %. U kolorektálního karcinomu měl HIPEC lepší výsledky u karcinomu kolon než rekta. Tento rozdíl ale může být způsobený menší radikalitou operačního výkonu u karcinomu rekta, kde prakticky ve všech případech šlo o lokoregionální recidivy. Podrobnější rozbor celého souboru je nad rámec této studie.

V posledních letech byly publikovány práce, které sledují efekt chirurgického výkonu + HIPEC (5, 9, 12, 16, 23, 49, 54, 70, 71 72, 74) v léčbě pokročilého karcinomu žaludku. V

těchto studiích se ukazuje potenciál této kombinované terapie. Některé studie (49, 71) ukazují lepší přežívání pacientů s intraabdominální peroperační hypertermickou chemoterapií a tyto rozdíly jsou statisticky významné. V obou je se uvádí nutnost pokud možno kompletní cytoredukce. Výsledky ovlivňuje rozsah postižení peritonea (pouze T3 a T4 vs. Gilly 1 - 2 vs. Gilly 3 - 4). Naproti tomu Hall (19) neprokazuje statisticky signifikantní zlepšení přežívání u souboru s a bez použití HIPEC. Metaanalýza z roku 2004 (69) pouze konstatuje, že HIPEC může přinést zlepšení výsledků léčby u pacientů s pokročilým karcinomem žaludku. V metaanalýze bylo zahrnuto 11 studií s celkovým počtem 1161 pacientů. Autoři ale uvádějí, že pouze 3 studie měly vyšší kvalitu podle Oxfordského skórovacího systému. Naproti tomu metaanalýza z roku 2007 (74), která zahrnuje 13 studií s celkem 1648 pacienty ukazuje statisticky signifikantní prodloužení přežití při kombinaci chirurgického výkonu doplněného intraoperační hypertermickou chemoterapií případně ještě doplněnou časnou pooperační intraperitoneální chemoterapií (EPIC). V roce 2009 byly publikovány výsledky Yanga (71), který porovnával skupinu nemocných s peritoneálním rozsevem u karcinomu žaludku, který byl léčen pouhou cytoredukcí, nebo cytoredukcí doplněnou HIPEC. Ve skupině s HIPEC bylo přežití lepší, ale bez statistické významnosti. Obdobné výsledky přinesla i multicentrická retrospektivní studie publikovaná v roce 2010 Glehenem (17) a v roce 2012 Yonemurou (72).

Naše výsledky u karcinomu žaludku jsou obdobné. Aplikace HIPEC spojená s extenzivní resekci u karcinomu žaludku měla významně pozitivní vliv na délku přežití a nepřímo můžeme soudit, že pozitivně ovlivnila i kvalitu života (pacientka nebyla hospitalizována pro komplikace peritoneální karcinomatózy – jako je ascites a ileus), ani nepodstoupila invazivní zákrok. Paliativní aplikace HIPEC bez resekčního výkonu neovlivnila přežití, ale kladně ovlivnila kvalitu života nemocných – především zabránila tvorbě maligního ascitu.

V roce 2011 začala mezinárodní multicentrická studie GASTROCHIP – D2 RESECTION AND HIPEC (HYPERTHERMIC INTRAPERITONEAL CHEMOPERFUSION) IN LOCALLY ADVANCED GASTRIC CARCINOMA A RANDOMIZED AND MULTICENTRIC PHASE III STUDY. Hlavním koordinátorem je prof. Garofalo. Do studie jsou zařazeni pacienti T3, 4, nebo N+, nebo s pozitivní peritoneální cytologií. Po 3 cyklech neoadjuvantní chemoterapie jsou nemocní randomizováni do 2 větví – s HIPEC a bez HIPEC. Výsledky budou k dispozici v roce 2020. Bohužel mezi státy, které se podílí na řešení, není ČR. (23). Design studie je obdobný studii, která byla připravena pracovníky FN Bulovka a opakovaně zamítnuta IGA MZ ČR.

Ve všech studiích je také sledován výskyt komplikací a úmrtí spojených s procedurou HIPEC. Yan (70) ve své metaanalýze zaznamenal vyšší riziko nitrobřišních abscesů a riziko neutropenie při použití HIPEC. Zhu (74) uvádí vyšší procento pooperačních komplikací ve své studii 23,08 % vs. 12,12 %, ale rozdíl není statisticky signifikantní. Nejčastější komplikací bylo renální selhání. Nezaznamenal úmrtí v souvislosti s chirurgickým výkonem. V jiné studii (49) je uváděna 30 denní letalita 5,4 % a dlouhodobou 11 %. Nejčastější komplikací byla intestinální píštěl. Hall (19) zaznamenal dvojnásobný výskyt pooperačních komplikací ve skupině s HIPEC 35 % vs. 17,5%, ale letalita byla vyšší v kontrolní skupině 15 % vs. 0 %.

Glockzin (18) uvádí po cytoreduktivním chirurgickém výkonu morbiditu 25 - 41 % a letalitu 0- 8 % (tyto údaje se vztahují i na jiné indikace než jen karcinom žaludku). Někteří dělí komplikace na chirurgické (insuficience anastomózy, pooperační ileus, infekce rány apod.) a komplikace spojené s peroperační chemoterapií, kam patří především leukopenie, anemie, trombocytopenie, kardio, hepato a nefrotoxicita (18, 74). Obdobně i Glehen (17). Gill ve svém review (16), kde retrospektivně soustředil údaje o 441 pacientech. V tomto souboru byla u výkonů doplněných HIPEC letalita 4,9% a morbidita 21%.

V roce 2012 se objevily první publikace o kombinaci R0 resekce a HIPEC s Gemcitabinem u karcinomu pankreatu. Nebyla zaznamenána vyšší morbidita ani letalita s HIPEC (58).

7 Splnění cílů práce.

1. ***Nalezení časného markeru peritoneální diseminace nádoru*** – v naší studii jsme potvrdili, že cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní je vhodným prognostickým markerem pro peritoneální recidivu. Přežití našich pacientů potvrdilo, že cytologický průkaz nádorových buněk, případně elevace intraperitoneální hladiny onkomarkerů ukazuje na mnohem pokročilejší onemocnění než odpovídá TNM klasifikace verze 6 a přežití těchto nemocných bylo obdobné jako u nemocných stadia IV. Tímto zjištěním jsme podpořili oprávněnost zavedení nové verze TNM klasifikace (7) i v našich podmínkách

2. ***Posouzení, zda je tento marker případně použitelný pro indikaci hypertermické intraoperační cytostatické laváže*** – nález pozitivní peritoneální cytologie, nebo elevace onkomarkerů, by mohl být vhodným indikátorem k aplikaci HIPEC. Bohužel nízká senzitivita v našich podmínkách zatím brání tomuto využití.

3. ***Stanovit význam volných nádorových buněk a hladiny onkomarkerů (CEA, Ca 19-9) v peritoneální tekutině pro určení prognózy onkologických nemocných a rizika peritoneální recidivy a diseminace*** – Naše práce potvrdila nepříznivý prognostický vliv peritoneálních cytologických i biochemických nálezů. Nepřímo tak ukázala nedostatky 6 verze klasifikace TNM a oprávněnost zavedení 7 verze této klasifikace.

4. ***Stanovení senzitivity a specifity těchto vyšetření***. Senzitivita cytologického vyšetření byla 34 % při specifitě 80 %, kombinace onkomarkerů při biochemickém vyšetření měla senzitivitu 53 % a specifitu 100 %

5. ***Posoudit význam těchto nálezů pro stanovení stadia a prognózy onemocnění*** – pacienti s pozitivním cytologickým nebo biochemickým nálezem mají life expectance odpovídající stadiu IV bez ohledu na ostatní faktory TNM klasifikace. V souboru našich pacientů s pokročilým karcinomem žaludku pozitivní biochemické a cytologické vyšetření bylo spojeno s technickou nemožností i paliativní resekce (v 100%). Toto pozorování dosud nebylo (dle našich poznatků) v literatuře publikováno, a pokud se ho podaří ověřit i v dalších studiích, může sloužit jako doplňující indikátor při indikaci paliativní resekce

6. ***Ověření vysoké senzitivity RT PCR pro diagnostiku volných nádorových buněk*** – tento závěr se nám nepodařilo potvrdit, protože se nám nezdařilo upravit techniku PCR používanou pro stanovení nádorových buněk v krvi nebo kostní dřeni, tak aby fungovala pro velmi heterogenní prostředí peritoneální laváže. Hlavním problémem byla vysoká degradace RNA, které se nepodařilo zabránit ani změnami odběrových a stabilizačních postupů.

7. ***Zjistit, zda je možné tyto markery použít k časně diagnostice peritoneální recidivy (v čase, kdy ji ještě nelze zjistit standardními zobrazovacími metodami)*** – metoda punkce peritoneální dutiny je zatížena stejně nízkým stupněm senzitivity jako při primárním vyšetření. Z tohoto důvodu t. č. nedoporučujeme zavedení tohoto vyšetření do rutinní praxe. Pokud se podaří zvýšit senzitivitu cytologického a biochemického vyšetření

peritoneální laváže, případně dosáhnout validních výsledků cestou RT PCR, plánujeme se k této otázce znovu vrátit (případně i v kombinaci s laparoskopií)

8. ***Zjistit jaký vliv má aplikace HIPEC na další průběh choroby*** – vzhledem k malému počtu nemocných (u sledovaných karcinomů) schopných podstoupit tento agresivní výkon jsou výsledky spíše kazuistické. Radikální operace doplněná HIPEC je zatížena vyšší morbiditou i mortalitou než operační výkon bez HIPEC, paliativní laváž dutiny břišní postižené peritoneální diseminací brání tvorbě maligního ascitu, bez ovlivnění doby přežití (zlepšení kvality života bez ovlivnění survival time). Komplikace pouhé paliativní HIPEC s výjimkou prolongovaného pooperačního ileu jsou srovnatelné s komplikacemi po explorativní laparotomii. Výsledky peritonektomie a HIPEC u ostatních diagnóz u nemocných operovaných na Chirurgické klinice Nemocnice Na Bulovce byly obdobné jako v jiných světových centrech. Nejlepší přežití mají nemocní s pseudomyxomem peritonea a peritoneálním mesoteliomem. Dále pacienti s karcinomatózou kolorektálního karcinomu a především karcinomu apendixu. Naproti tomu žádný benefit jsme nepozorovali u pacientů s uroteliálním karcinomem. Jako významné hodnotíme prioritní pozorování, že HIPEC zabraňuje tvorbě maligního ascitu, které bylo již potvrzeno jinými pracovními skupinami a dnes je tato indikace uznávaná v paliativní léčbě této diagnózy.

8 Závěr

Literární zkušenosti i naše vlastní výsledky ukazují, že zařazení cytologického vyšetření do algoritmu vyšetření nemocných s malignitou horní části trávicího ústrojí může přinést profit nemocným postiženým maligním tumorem i ve stadiu generalizace. Buď v event. aplikaci agresivnějších adjuvantních protokolů v případě positivity cytologie, nebo ve zvážení, jak využít kombinovaných onkochirurgických postupů (hypertermická intraoperační cytostatická laváž, nebo peroperační radioterapie). Přesnou úlohu cytologického vyšetření v těchto indikacích ukáží až budoucí studie.

Je však nutné zpřesnit diagnostiku volných nádorových buněk v peritoneální dutině, protože naše zkušenosti ukazují, že především senzitivita, ale i specifita klasického cytologického vyšetření není dosud na dostatečné úrovni, aby se mohla bez problému využít v klinické praxi. Použití onkomarkerů, především v kombinaci CEA a Ca 19-9 senzitivitu sice zvyšuje, ale k dalšímu zpřesnění by velmi pomohlo zařazení dalších onkomarkerů do běžného využití (Ca 15 - 3, Ca 72 – 4, Ca 125).

Zavedení vysoce specifické RT PCR v naší studii bránil vysoký stupeň degradace nádorové RNA ve vzorcích a zároveň kontaminace vzorků dalšími buňkami – krevními, peritoneálními apod.

V souvislosti s přechodem na novou verzi klasifikace AJCC, kde nastaly změny především v klasifikaci karcinomu žaludku, by bylo vhodné a správné zavést cytologické vyšetření do rutinní praxe. *Oprávněnost tohoto přístupu, i v našich podmínkách, je podpořena výsledky naší studie, kde je patrná výrazně horší prognóza pacientů s pozitivním cytologickým vyšetřením z laváže dutiny břišní.*

Prioritní pozorování týmu prof. Antoše, z nějehož pracoviště tato práce vzešla, že *intraoperační hypertermická cytostatická laváž brání vzniku maligního ascitu*, bylo již potvrzeno dalšími centry. V současné době je prevence vzniku maligního ascitu zařazena mezi uznávané indikace HIPEC.

Zjištění autorů této studie, že pozitivní výsledek peritoneální cytologie ve stadiu IV byla prakticky vždy spojena s neresekabilním nálezem, dosud není verifikován dalšími pracemi. Může být ale vodítkem při rozhodování o provedení paliativní resekce. Miniinvazivní technikou získaný materiál pro cytologické vyšetření by v případě pozitivního nálezu zabránil zbytečné laparotomii.

9 Literatura

- 1) Abu-Hijleh M. F et al: The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity, *J. Anat.* (1995) 186, s. 453-467
- 2) Aiko, T., Sasako, M.: The new Japanese clasification of gastric carcinoma: points to be revised. *Gastric Cancer* (1998) 1, s. 25 – 30
- 3) AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER: AJCC CANCER STAGIN MANUAL, Seventh Edition, Springer New York Dordrecht Heidelberg London 2010, ISBN 978-0-387-88440-0, s. 646
- 4) American Joint Committee on Cancer: AJCC Cancer Staging Atlas, Springer 2006, ISBN-10: 0-387-29014-1, s. 452
- 5) B. Detroz, S. Laurent, P. Honoré, F. Blaffart*, R. Limet*, M. Meurisse: Rationale for Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy (HIPEC) in the Treatment or Prevention of Peritoneal Carcinomatosis, *Acta chir belg*, 2004, 104, s. 377-383
- 6) Bando, E., Yonemura, Y., Takeshita, Y., Taniguchi, K., Yasui, T., Yoshimitsu, Y., Fushida, S., Fujimura, T., Nishimura, G., Miwa, K.: Intraoperative lavage for cytological examination in 1297 patients with gastric carcinoma. *Am J Surg* (1999), 178, s. 256 – 262
- 7) Bold, R., Ota, D.M., Ajani, J. A., Mansfield, P. F.: Peritoneal and serum tumor markers predict recurrence and survival of patients with resectable gastric cancer. *Gastric Cancer* (1999), 2, s. 1 – 7
- 8) Burke, E. C., Karpeh jr., M. S., Conlon, K. C., Brennan, M. F.: Peritoneal lavage cytology in gastric cancer: an independent predictor of outcome. *Annals Surg Onc* (1998) 5, s. 411 – 415
- 9) Ceelen W. P. et al: Peritoneal Carcinomatosis. A Multidisciplinary Approach, Springer 2007, ISBN 978-0-387-48991-9, s 536
- 10) Clarc C. J. et al: Gastric cancer, *Curr Probl Surg*, Vol 43, No 8/9, 2006, s. 566 - 670
- 11) de Manzoni, G., Verlato, G., Di Leo, A., Tomezzoli, A., Pedrazzani, C., Pasini, F., Piubello, Q., Cordiano, C.: Peritoneal cytology does not increase the prognostic information provided by TNM in gastric cancer. *World J Surg* (2006) 30, s. 579 – 584
- 12) Deraco, M.: Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Hyperthermic Perfusion, *European Oncological Disease* 2007;1(1), s. 125-9
- 13) EUNE for Gastric Cancer Steering Group: Gastric cancer in Europe, *British Journal of Surgery* 2008, 95, s. 406 - 408
- 14) Gall F. P., Hermanek P., Tonak J.: *Chirurgische Onkologie*, Springer Verlag 1986 ISBN 3-540-13202-3, s. 347
- 15) Ghadimi, B. M., Shlag P. M.: Tumormetastasierung, *Der Chirurg* 1998, 85, s. 1315 – 1322
- 16) Gill R. S., Al-Adra D. P., Nagendran J ad: Treatment of Gastric Cancer With Peritoneal Carcinomatosis by Cytoreductive Surgery and HIPEC: A Systematic Review of Survival, Mortality, and Morbidity, *Journal of Surgical Oncology* 2011;105, s. 1–7
- 17) Glehen, O. et al: Peritoneal Carcinomatosis from Gastric Cancer: A Multi-Institutional Study of 159 Patients Treated by Cytoreductive Surgery Combined with Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy, *Ann Surg Oncol* (2010) 17: s. 2370 - 2377
- 18) Glockzin G., Schlitt J. H., Piso P.: Peritonea carcinomatosis: patiens selection, perioperative complications and duality of life related to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy, *World Journal of Surgical Oncology*, 2009,7, s. 5 - 10

- 19) Hall, I. J. et al: Cytorreductive Surgery With Intraperitoneal Hyperthermic Chemotherapy for Advanced Gastric cancer, *J Gastrointest Surg* 2004, 8, s. 454 - 463
- 20) Hayashi, N., Marutsuka, T., Maeda, T., Egami, H., Oqawa, M.: Establishment of rapid procedure for one-step real-time reverse transcription-polymerase chain reaction in combination with automated mRNA extraction: a clinical application to intra-operative molecular diagnosis of cancer cells. *International Congress Series* (2003) 1255, s. 109 – 117
- 21) Hermanek P et al: Classification of Isolated Tumor Cells and Micrometastasis, *CANCER* December 15, 1999 / 86 / Number 12, s. 2668 - 2673
- 22) Hermanek, P.: Pathology and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Langenbeck's Arch Surg* (1998), 5, s. 116 – 120
- 23) http://www.sicoonline.org/00_materiali/protocolli/2011_GASTRICHIP_V2_Protocol_2011-02-03_Europe.pdf
- 24) Chány A. E. et al.: *Oncology*, Springer 2006, ISBN 10: 0-387-24291-0, s. 2015
- 25) Chuwa, E. W. L., Khin, L.W., Chan, W.H., Ong, H.S., Wong, W.K.: Prognostic significance of peritoneal lavage cytology in gastric cancer in Singapore. *Gastric Cancer* (2005) 8, s. 228 – 237
- 26) Ishihara S et al: Status of Surgical Treatment of Biliary Tract Cancer, *Dig Surg* 2007;24:s. 131-136
- 27) Japanese Gastric Cancer Association:: Japanese Classification of Gastric Carcinoma - 2nd English Edition, *Gastric Cancer* (1998) 1: s. 10–24
- 28) JCGA: Introduction to JGCA gastric cancer treatment guidelines, <http://www.jgca.jp/PDF/files/E-guideline.PDF>
- 29) Jimenez, R. E., Warshaw, A. L., Fernandez-del Castillo, C.: Laparoscopy and peritoneal cytology in the staging of pancreatic cancer. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* (2000), 7, s. 15 – 20
- 30) Kayhara M. Nagakawa T.: Recent Trend of Gallbladder Cancer in Japan, *Cancer* 2007, 110, No 3, s. 572 - 580
- 31) Kloudo, N. et al: Strategies for Surgical Treatment of Gallbladder Carcinoma Based on Information Available Before Resection, *Arch Surg* 2003, 138, s. 741 – 750
- 32) Kodera, Y., Nakanishi, H., Ito, S., Yamamura, Y., Kanemitsu, Y., Shimizu, Y., Hirai, T., Yasui, K., Kato, T., Tatematsu, M.: Quantitative detection of disseminated cancer cells in the greater omentum of gastric carcinoma patients with real-time RT-PCR: a comparison with peritoneal lavage cytology. *Gastric cancer* (2002) 5, s. 69 – 76
- 33) Leach, S. D., Rose, J. A., Lowy, A. M., Lee, J. E., Charnsangavej, C., Abuzzese, J. L., Katz, R. L.: Significance of peritoneal cytology in patients with potentially resectable adenocarcinoma of the pancreatic head. *Surgery* (1995), 118, s. 472 – 478
- 34) Li, J.K., Zheng, M., Miao, C.W., Zhang, J.H., Ding, G.H., Wu, W.S.: Peritoneal lavage cytology and carcinoembryonic antigen determination in predicting peritoneal metastasis and prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* (2005), 46, s. 7374 – 7377
- 35) Liu, R. C., Traverso, L. W.: Diagnostic laparoscopy improves staging of pancreatic cancer deemed locally unresectable by computed tomography. *Surg Endosc* (2005), 19, s. 638 – 642
- 36) Lowenfels A. B.: Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* Vol. 20, No. 2, s. 197–209, 2006
- 37) Majima, T., Ichikura, T., Mochizuki, H.: Prognostic significance of the cytologic features of free cancer cells in the peritoneal cavity of patients with gastric cancer. *Surg Today* (2002) 32, s. 35 – 39
- 38) Makary, M. A., Warshaw, A. L., Centeno, B. A., Willett, C. G., Rattner, D. W., Fernandez-del Castillo, C.: Implications of peritoneal cytology for pancreatic cancer management. *Arch Surg* (1998) 133, s. 361 – 365

- 39) Marutsuka, T., Shimda, S., Shiomori, K., Ogawa, M.: Peritoneal metastasis after operation for non-serosa-invasive gastric carcinoma and a prophylactic strategy for peritoneal dissemination. *International Congress Series* (2003) 1255, s. 103 – 107
- 40) Merchant, N. B., Conlon, K. C.: Laparoscopic evaluation in pancreatic cancer. *Semin Surg Oncol* (1998), 15, s. 155 – 165
- 41) Miyashiro, I., Takachi, K., Doki, Y., Ishikawa, O., Ohigashi, H., Murata, K., Sasaki, Y., Imaoka, S., Nakaizumi, A., Takenaka, A., Furukawa, H., Hiratsuka, M.: When is curative gastrectomy justified for gastric cancer with positive peritoneal lavage cytology but negative macroscopic peritoneal implant? *World J Surg* (2005) 9, s. 1131 - 1134
- 42) Nakanishi, H., Kodera Y., Yamamura, Y., Kuzuya, K., Nakanishi, T., Ezaki, T., Tatematsu, M: Molecular diagnostic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of patients with gastrointestinal and gynecologic malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol* (1999) 43(Suppl) s. 32 – 36
- 43) Nieveen van Dijkum, E. J. M., Sturm, P. D., de Wit, L. Th., Offerhaus, J., Obertop, H., Gouma, D. J.: Cytology of peritoneal lavage performed during staging laparoscopy for gastrointestinal malignancies: is it useful? *Anal of Surg* (1998) 228, s. 728 – 733
- 44) Nishiyama, M., Takashima, I., Tanaka, T., Yoshida, K., Toge, T., Nagata, N., Iwamori, S., Tamura, Y.: Carcinoembryonic antigen levels in the peritoneal cavity: useful guide to peritoneal recurrence and prognosis for gastric cancer. *World J Surg* (1995) 19, s. 133 – 137
- 45) Pantel K., Cote J. V., Fodstad Q: Detection and Clinical Importace of Micrometastatic Disease, *Journal of the National Cancer Institute*, 91, No 13, 1999 s. 1113 - 1124
- 46) Ribeiro jr., U., Gama – Rodrigues, J. J., Bitelman, B., Ibrahim, R. E., Safatle – Ribeiro, A. V., Laudanna, A. A., Pinnotti, H. W.: Value of peritoneal lavage cytology during laparoscopic staging of patients with gastric carcinoma. *Surg Laparoscop Endosc* (1998) 8, s. 132 – 135
- 47) Rosenberg, R., Nekarda, H., Bauer, P., Schenck, U., Hoefler, H., Siewert, J. R.: Free peritoneal tumour cells are an independent prognostic factor in curatively resected stage IB gastric carcinoma. *Br J Surg* (2006) 93, s. 325 – 331
- 48) Roth A. D.: Curative treatment of gastric cancer: towards a multidisciplinary approach? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 46, 2003, s. 59 – 100
- 49) Scaringi, S. et al: Advanced gastric cancer with orwithout peritoneal carcinomatosis treated with hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: A single western center experience, *EJSO* 34 (2008) s. 1246- 1252
- 50) Shield, P.: Peritoneal washing cytology. *Cytopathology* (2004) 15, s. 131 – 141
- 51) Schmidt, J., Fraunhofer, S., Fleisch, M., Zirngibl, H.: Is peritoneal cytology a predictor of unresectability in pancreatic carcinoma? *Hepato-gastroenterology* (2004) 51, s. 1827 – 1831
- 52) Siewert J. R. et all: Gastric Cancer, *Current Problems in Surgery*, Vol 34, No 11, 1997, s. 461 - 516
- 53) Stefanidis, D., Grove, K. D., Schwesinger, W. H., Thomas jr., C. R.: The current role of staging laparoscopy for adenocarcinoma of the pancreas: a review. *Annals of Oncology* (2006), 17, s. 189 – 199
- 54) Sugerbaker, P. H.: *Technical Handbook for integration of Cytoreductive Surgery and Perioperative Intraperitoneal Chemotherapy into the Surgical Management of Gastrointestinal and Gynecologic Malignancy*, Washington cancer institute, 2005, s. 67
- 55) Suzuki, T., Ochiai, T., Hayashi, H., Hori, S., Shimada, H., Isono, K.: Peritoneal lavage cytology findings as prognostic factor for gastric cancer. *Semin Surg Oncol* (1999), 17, s. 103 – 107
- 56) Swan, R., Miner, T. J.: Current role of surgical therapy in gastric cancer. *World J Gastroenterol* (2006) 12, s. 372 – 379

- 57) Tanaka, N., Nobori, M., Suzuki, Y.: Does bile spillage during an operation present a risk for peritoneal metastasis in bile duct carcinoma? *Surg Today JpN J Surg* (1997) 27, s. 1010 – 1014
- 58) Tentes A-A. K., Kyziridis D., Kakolyris S. ad: Preliminary Results of Hyperthermic Intraperitoneal Intraoperative Chemotherapy as an Adjuvant in Resectable Pancreatic Cancer, *Gastroenterology Research and Practice* Volume 2012, Article ID 506571, 5 pages
- 59) Tobias J., Hochhauser D.: *Cancer and its management*, Wiley – Blackwell 2010 ISBN: 9781405170154, s. 561
- 60) Townsend C. M. et al: *Sabiston Textbook of Surgery*, Elsevier Saunders 2004, ISBN 0-7216-0409-9, s. 688
- 61) Traverso, L. W.: Pancreatic cancer: surgery alone is not sufficient. *Surg Endosc* (2006) 20, s. 446 – 449
- 62) Vogel, P., Rüschoff, J., Kümmel, S., Zirngibl, H., Hofstädter, F., Hohenberger, W., Jauch, K. – W.: Prognostic value of microscopic peritoneal dissemination. *Dis Colon Rectum* (2000), 43, s. 92 – 100
- 63) Wang, JY., Lin, SR., Lu, CY., Chen, CC., Wu, DC., Chai, CY., Chen, FM., Hsieh, JS., Huang, TJ.: Gastric cancer cell detection in peritoneal lavage: RT – PCR for carcinoembryonic antigen transcripts versus combined cytology with peritoneal carcinoembryonic antigen levels. *Cancer Letters* (2005) 223, s. 129 – 135
- 64) Warshaw, A. L.: Implications of peritoneal cytology for staging of early pancreatic cancer. *Am J Surg* (1991) 161, s. 26 – 30
- 65) Wells jr., S. A. (ed): *Gastric cancer. Current Problems in Surgery* (2006) 43, s. 558 – 669
- 66) Wells S. A. et al: Malignancies of the biliary tract, *Current Problems in Surgery*, Vol 32, No 1, 1995. S. 1 - 89
- 67) Wilkiemeyer, M. B., Bieligm, S. C., Ashfaq, R., Jones, D. B., Rege, R. V., Fleming, J. B.: Laparoscopy alone is superior to peritoneal cytology in staging gastric and esophageal carcinoma. *Surg Endosc* (2004) 18, s. 852 – 856
- 68) www.svod.cz
- 69) Xu, DZ, Zhan YQ, Sun XW, et al.: Meta-analysis of intraperitoneal chemotherapy for gastric cancer, *World J Gastroenterol* 2004, 10(18): s. 2727 - 2730
- 70) Yan, T. D et al: A Systematic Review and Meta-analysis of the Randomized Controlled Trials on Adjuvant Intraperitoneal Chemotherapy for Resectable Gastric Cancer, *Annals of Surgical Oncology* 14 (10): s. 2702 - 2713
- 71) Yang, X-J, Huang C-Q, Suo T., Mei L-J ad: Cytoreductive Surgery and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy Improves Survival of Patients with Peritoneal Carcinomatosis from Gastric Cancer: Final Results of a Phase III Randomized Clinical Trial, *Ann Surg Oncol* (2011) 18:s. 1575–1581
- 72) Yonemura Y., Elnemr A., Endou Y ad: Effects of Neoadjuvant Intraperitoneal/Systemic Chemotherapy (Bidirectional Chemotherapy) for the Treatment of Patients with Peritoneal Metastasis from Gastric Cancer, *International Journal of Surgical Oncology* Volume 2012, Article ID 148420, 8 pages
- 73) Ze-Yu Wu, Jing-Hua Li, Wen-Hua Zhan, Yu-Long He, Jin Wan: Effect of lymph node micrometastases on prognosis of gastric carcinoma, *World J Gastroenterol* 2007 August 14; 13(30): s. 4122-4125
- 74) Zhu ZG, et al: Efficacy and Safety of Intraoperative Peritoneal Hyperthermic Chemotherapy for Advanced Gastric Cancer Patients with Serosa Invasion, *Dig Surg* 2006, 23, s. 93 - 102

10 Přehled publikací souvisejících s výzkumem

Seznam publikací:

1. publikace in extenso, které jsou podkladem disertace

a) s IF

David Hoskovec, Jozef Varga, Ellen Konečná, František Antoš
Levels of CEA and Ca 19 - 9 in the sera and peritoneal cavity in patients with gastric and pancreatic cancers

[Acta Cir Bras.](#) 2012 Jun;27(6):410-6. (IF 0,626)

Hoskovec D, Varga J, Antos F, Kaspar M, Vitek P, Benkova K, Dytrych P, Konecna E
Palliative treatment of the advanced gastric cancer by means of surgery and HIPEC – case report

Bratislava Medical Journal (IF 0,472)

Hoskovec D., Varga J., Antoš F., Marvan J., Hromádková E., Vokurka J., Benková K., Sýkora V., Ulrych J.

Peritoneal lavage cytology and biochemistry in cases of upper GI tumors

South African Journal of Surgery (IF 0,362)

b) bez IF

HOSKOVEC, David — ANTOŠ, František. Novinky v chirurgii. Revizní a posudkové lékařství, 2007, roč. 10, č. 4, s. 47-52

HOSKOVEC, David — ANTOŠ, František. Novější možnosti chirurgické léčby. Praktický lékař, 2007, Roč. 87, č. 11, s. 654-658

HOSKOVEC, David. Rozsah lymfadenektomie u karcinomu žaludku. Časopis lékařů českých, 2012, roč. 151, č. 4, s. 217-218. ISSN: 0008-7335

HOSKOVEC, David. Chirurgická onemocnění jícnu a žaludku na prahu 21. století. Rozhledy v chirurgii, 2012, roč. 91, č. 5, s. 286-289. ISSN: 0035-9351

2. publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

a) s IF

b) bez IF

HOSKOVEC, David. Léčba karcinomu žaludku a gastroezofageální junkce. Postgraduální medicína, 2012, roč. 14, č. 4, s. 416-421.

FRÝBA, V. — FRAŠKO, Roman — HOSKOVEC, David, et al. Kolorektální karcinom na I. chirurgické klinice VFN Praha. Rozhledy v chirurgii, 2012, roč. 91, č. 5, s. 290-293. ISSN: 0035-9351

HOSKOVEC, David. Indikace k laparoskopii se stále rozšiřují. Zdravotnické noviny, 2011, roč. 60, č. 27-28 (Kongresový list), s. 8 příl...

HOSKOVEC, David — HLEDÍK, Emil — KAŠPAR, Miroslav, et al. Méně obvyklý sekundární tumor pankreatu. Česká a slovenská gastroenterologie a hepatologie, 2005, Roč. 59, č. 4, s. 162-164.

KAŠPAR, Miroslav — HOSKOVEC, David — BERAN, T., et al. Perkutánní léčba pseudocyst pankreatu. Česká radiologie, 2005, Roč. 59, č. 6, s. 315-322.

KAŠPAR, Miroslav — HOSKOVEC, David — BERAN, T., et al. Těžká akutní pankreatitida, perkutánní léčba. Česká radiologie, 2005, Roč. 59, č. 6, s. 304-314.

HOSKOVEC, David — JAROŠ, Karel — HLEDÍK, Emil — SCHAUTA, M. Iatrogenní léze žlučových cest - Možnosti terapie a dlouhodobé výsledky léčby. Bulletin HPB, 2003, roč. 11, č. 2, s. 63-65.

HOSKOVEC, David — ANTOŠ, František. Příspěvek k problematice biliárních peritonitid. Rozhledy v chirurgii, 2000, Roč. 79, č. 7, s. 286-290.

HOSKOVEC, David. Krvácející jícnové varixy. Postgraduální medicína, 1999, Roč. 1, č. 4, s. 13-23.

HOSKOVEC, David. Přehled komplikací vředové choroby žaludku a duodena. Zdravotnické noviny, 1999, Roč. 48, č. 12.

HOSKOVEC, Daniel — ŠANDA, Ludvík. *Mladý zdravotník I: [pomůcka pro přípravu k získání odznaku Mladý zdravotník I. stupně v kroužcích ČSČK]*. [Praha] : Český výbor Československého červeného kříže, 1992. 26 s.

HOSKOVEC, David — ŠANDA, Ludvík. *Mladý zdravotník II: [pomůcka pro přípravu k získání odznaku Mladý zdravotník II. stupně v kroužcích ČSČK]*. [Praha] : Český výbor Československého červeného kříže, 1992. 54 s.

Prezentace na kongresech, sympoziích:

Hoskovec D., Antoš F., Marvan J., Hledík E., Mašek, Benková K.

Surgical treatment of gastrointestinal stromal tumours – single centre experience

8th Annual Meeting European Society of Surgery

11 – 14. 11. 2004

Malta

Hoskovec D., Hledík E., Kašpar M., Klézl P., Benková K., Varga J.

Méně obvyklý sekundární tumor pankreatu

Pracovní den ČGS – Kazuistiky, Praha 24. 2. 2005

Hoskovec D., Varga J., Kašpar M., Benko P., Benková K.

Eosinofilní duodenitis u nemocného s podezřením na karcinom hlavy pankreatu – kazuistika

II. kongres chirurgie jater, žlučových cest a pankreatu

Resort Darovanský dům, Plzeň, 23. – 24. 6. 2005

Hoskovec D., Antoš F., Kudrmann J., Benková K., Varga J.:

Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u nádorů horní části GIT

Dny diagnostické, prediktivní a experimentální onkologie Olomouc 9. – 10. 12. 2005

Hoskovec D., Antoš F., Kudrmann J., Varga J., Benková K.:

Výsledky vyšetření laváže dutiny břišní u nádorů gastroduodena a biliopankreatické oblasti

Harrachovské chirurgické dny, Harrachov 1. – 2. 6. 2006

Hoskovec D., Antoš F., Kudrmann J., Varga J., Benková K.:

Výsledky vyšetření laváže dutiny břišní u nádorů gastroduodena a biliopankreatické oblasti

IV. slovenský chirurgický kongres s mezinárodní účastí, XXXV. Společný kongres slovenských a českých chirurgů, Nitra 6. – 8. 9. 2006

Hoskovec, D., Antoš F., Kudrmann J., Varga, J., Benková K., Klobušický P.:

Peritoneal lavage examination int patients with gastric and biliopancreatic tumours - preliminary resoults.

Annual conference ESS. Kypr, Limassol, 8.-11.11.2006.

Hoskovec D., Varga J., Antoš F., Dytrych P., Benková K.:
Peritoneal lavage cytology and biochemistry in cases of gastric and biliopancreatic
tumors
European Society of Surgery, 12th Annual Conference, Naples, Italy, 27.-29.11. 2008

Hoskovec D., Varga J., Antoš F., Dytrych P., Benková K.:
Cytologické a biochemické vyšetření laváže dutiny břišní u pacientů s karcinomem
biliopankreatického ústrojí
10. vzdělávací a diskusní gastroenterologické dny, Karlovy Vary, 6. – 8. 11. 2008

Hoskovec D., Varga J., Antoš F., Dytrych P., Benková K.
Výsledky cytologického a biochemického vyšetření laváže dutiny břišní a jejich
korelace s klinickým nálezem u pacientů s karcinomem žaludku
V. český chirurgický sjezd, XXXVI. Společný sjezd českých a
slovenských chirurgů XV. Pražské chirurgické dny, 8. – 10. 10. 2008 Praha

Hoskovec D., Antoš, F., Varga, J., Benková, K...: Diagnostika volných nádorových
buněk v peritoneální dutině
XII. Bedrnův den 23. - 24. 4. 2009

Hoskovec D., Varga J., Kašpar M., Antoš F., Benková K.
Cytologické vyšetření laváže dutiny břišní u pacientů s GIST
XXIII. Petrživalského-Rapantův chirurgický den Olomouc 29. – 30. 4. 2010